



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Odontología

Escuela Académico Profesional de Odontología

**Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del
extracto de *Erythroxylum coca* sobre bacilos negro
pigmentantes**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Carmen Paola ENCISO DEZA

ASESOR

Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2016



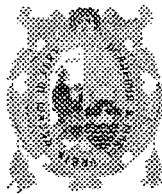
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Enciso C. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre bacilos negro pigmentantes [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Académico Profesional de Odontología; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el dieciocho de abril del 2016, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

ENCISO DEZA, Carmen Paola

CERTIFICAN :

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* Sobre BACILOS NEGRO PIGMENTANTES** »

y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento:

..... sobresaliente siendo calificado con un promedio
de: diecinueve 19

(en letras)

(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los dieciocho días del mes de abril del dos mil dieciséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

.....
Mg. C.D. Víctor Narciso Lévano Torres

MIEMBRO

.....
C.D. Epc. Sylvia Antonieta Chen Villacampa

MIEMBRO (ASESOR)

.....
Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:

Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)

Criterios: Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

JURADO

Presidente: Mg. C.D. Victor Narciso Lévano Torres

Miembro: C.D. Esp. Sylvia Antonieta Chein Villacampa

Miembro asesor: Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

A Dios, por cuidarme y guiarme siempre.

*A mis padres, por su constante apoyo, amor y motivación para culminar este
proyecto.*

A mi hermano, por su cariño y complicidad día a día.

A Manuel, por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

A Nena, por ser mi ángel guardián.

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto, profesor de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, asesor de la presente tesis, por su apoyo, paciencia y consejos día a día.

Al Mg. C.D. Víctor Narciso Lévano Torres, Director Administrativo de la Facultad de Odontología de la UNMSM, presidente del jurado revisor de borrador de tesis, por su orientación y consejos en la realización de este trabajo.

A la C.D. Esp. Sylvia Antonieta Chein Villacampa, miembro del jurado revisor de borrador de tesis, por su apoyo y orientación en el desarrollo de este estudio.

A la Dra. Silveria Dongo, jefa del servicio de investigación de ENACO SA. Por las facilidades y ayuda brindada para la obtención del Extracto de Hoja de Coca, elaborados en esta Institución.

Al Lic. Ronald Torres Martínez, Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional Docente Madre-Niño “San Bartolomé”, por su gran apoyo en el procesamiento de datos y análisis estadístico de la presente tesis.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su orientación durante la ejecución.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi Alma Máter; y especialmente a la Facultad de Odontología y sus docentes, por tantas enseñanzas impartidas y permitirme ser parte de esta prestigiosa casa de estudios.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana del extracto de hoja de coca (*Erythroxylum coca*), sobre Bacilos Negro Pigmentantes (BNP), dichas bacterias son bacilos anaerobios Gram negativos, y están fuertemente relacionadas con la progresión de la Periodontitis; para lo cual se empleó dos pruebas; la primera, el Test de Difusión en Agar y la segunda, la prueba de dilución en medio líquido.

Las cepas de BNP fueron aisladas desde muestras tomadas de bolsas periodontales (mayores a 4 mm) de pacientes con enfermedad periodontal atendidos en la Facultad de Odontología de la UNMSM. El extracto de hoja de coca fue obtenido de la Empresa Nacional de la Coca (ENACO).

Los resultados de la primera prueba indicaron sensibilidad nula (-) para la mayor parte de las concentraciones evaluadas, y sensibilidad límite (sensibilidad: +) para las concentraciones de 12,5 % y 100 %. Los resultados del segundo estudio determinaron una concentración mínima del extracto capaz de inhibir el crecimiento de dicha bacteria, 100 % (CMI), y a las concentraciones de 12,5 % y 6,25 % se observa una repotenciación del efecto antibacteriano del extracto.

Por lo tanto se concluye, que el extracto de hoja de coca, sí presenta una actividad antibacteriana frente a BNP, a las concentraciones de 100% y 12,5%.

PALABRAS CLAVE: Extracto, coca, antibacteriano, bacterias anaerobias.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the antibacterial activity of the extract of coca leaves (*Erythroxylum coca*), on Black Pigmented Bacteria (BNP). Those periodontopathogenic bacterias are Gram negative and strict anaerobic, also they are strongly related with the progression of periodontitis.

To this purpose, the study used two different kinds of tests; the first, Agar Diffusion Test; and the second, Dilution Test in Liquid Medium.

BNP strains were isolated from samples taken from periodontal pockets (greater than 4 mm) of patients with periodontal disease treated at the Faculty of Dentistry of San Marcos University. The coca leaf extract was obtained from the National Coca Company (ENACO).

The results of the first study indicated that the extract of *Erythroxylum coca* has zero sensitivity (-) for most of the tested concentrations, and sensitivity limit (sensitivity: +) to the concentration of 12,5 % and 100 %. The results of the second study determined a minimum concentration of extract able to inhibit the growth of said bacterium; this value was 100% (CMI) Also, concentrations of 12,5 % and 6,25 %, both indicated repowering of the antibacterial effect of the extract.

Therefore it is concluded that, the extract of coca leaf has an antibacterial activity against BNP, in concentrations of 100% and 12, 5%.

KEY WORDS: Extract, coca, antibacterial, anaerobic bacteria.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 ANTECEDENTES.....	12
2.2 BASES TEÓRICAS.....	17
2.2.1 ANTIBACTERIANOS NATURALES.....	17
2.2.2 HOJA DE COCA (<i>Erythroxylum coca</i>).....	18
2.2.3 BACILOS NEGRO PIGMENTANTES.....	23
2.2.1.1 FAMILIA BACTEROIDACEAE.....	24
2.2.1.2 GÉNERO PREVOTELLA.....	25
2.2.1.3 GÉNERO PORPHYROMONAS.....	27
2.2.2 TRATAMIENTO ANTIBACTERIANO.....	29
2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
2.4 JUSTIFICACIÓN.....	31
2.5 OBJETIVOS.....	32
2.6 HIPÓTESIS.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	33
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	33
3.3 OPERACIONALIZACIONDE VARIABLES.....	34
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.4.1 RECURSOS.....	37
3.4.2 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	39
3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	42
3.6 ANALISIS DE RESULTADOS.....	42
IV. RESULTADOS.....	43
V. DISCUSIÓN.....	72

VI. CONCLUSIONES.....	
VII. RECOMENDACIONES.....	
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	78
IX. ANEXOS.....	84
9.1 CUADRO DE CONSISTENCIA.....	84
9.2 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	86
9.3 CUADROS Y GRÁFICOS.....	88
9.4 TABLAS DE INTERPRETACIÓN DE DATOS.....	92
9.5 FIGURAS.....	94

RESULTADOS: ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	44
Tabla 2.....	46
Tabla 3.....	48
Tabla 4.....	50
Tabla 5.....	52
Tabla 6.....	54
Tabla 7.....	56
Tabla 8.....	58
Tabla 9.....	60
Tabla 10.....	62
Tabla 11.....	64
Tabla 12.....	67
Tabla 13.....	69
Tabla 14.....	69

RESULTADOS: ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....49

Figura 2.....51

Figura 3.....53

Figura 4.....55

Figura 5.....57

Figura 6.....59

Figura 7.....61

Figura 8.....63

Figura 9.....65

Figura 10.....66

Figura 11.....70

Figura 12.....71

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las Enfermedades Periodontales representan las enfermedades bucales más prevalentes que afectan en el Perú, junto con la caries dental. Aproximadamente afecta al 85 % de la población. Su etiología y desarrollo se ha relacionado por años con la presencia de microorganismos periodontopatógenos, los cuales producen la destrucción de los tejidos de soporte del diente; entre estas bacterias, se encuentran las Bacterias Negro Pigmentantes (BNP), las cuales son bacterias anaerobias estrictas, Gram (-), que habitan el fondo de bolsas periodontales, destacándose entre estos los pertenecientes a la familia Bacteroidaceae, representados por los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*. Han sido fuertemente relacionadas por estudios previos, con la Periodontitis.

El tratamiento de esta enfermedad consiste en el control de placa bacteriana, y el uso de agentes antimicrobianos (colutorios medicados, terapia antibiótica, entre otros). Pero existen algunas especies, que debido al mecanismo de producción de beta-lactamasa, generan resistencia antibiótica. Por esto, se ha dado énfasis al estudio de sustancias naturales, especialmente a aquellas que contienen polifenoles, como la Hoja de Coca. Hoy en día las sustancias derivadas de plantas constituyen aproximadamente el 25 % de las medicinas prescritas.

Se realiza entonces el presente estudio, con la finalidad de conocer si existe actividad antibacteriana del extracto de hoja de coca sobre dichos Bacilos Negro Pigmentantes (BNP). Para esto se recurre a dos pruebas; la primera, el Test de difusión en Agar y la segunda, la prueba de dilución en medio líquido. Además, a partir de los resultados obtenidos, se podría determinar si dicho extracto sería útil para crear un producto que actúe como agente antiséptico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Ardila MC. y cols. 2013. Estudiaron la prevalencia de *Prevotella intermedia/nigrescens* y de bacilos entéricos gram negativos en 76 pacientes con periodontitis crónica. El 46,7 % y 26,31 % de los pacientes presentaron *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos gram-negativos, respectivamente. En el 22% de los sujetos se observaron simultáneamente los microorganismos estudiados. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa entre *P. intermedia/nigrescens* y bacilos entéricos Gram negativos. La presencia de los microorganismos estuvo positivamente correlacionada con profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica y presencia de sangrado³³.

Rams TE. et al. 2013. Realizaron un estudio clínico en 564 pacientes adultos con periodontitis crónica severa. Antes del tratamiento, se tomó muestras de placa subgingival de bolsas periodontales profundas que presentaban sangrado al sondaje. Se encontró *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia / nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* y otras especies de *Prevotella*. El 52,1% de los pacientes del estudio tuvieron respuesta positiva a la producción de betalactamasa. Además, el 98,9 % de cepas bacterianas aisladas fueron sensibles in vitro al Metronidazol³⁵.

Ramos CA. 2012. Determinó la actividad antibacteriana, *in vitro*, del extracto hidroalcohólico de hoja de coca (*Erythroxylum coca*), sobre la cepa ATCC 33277 *Porphyromonas gingivalis*, dando como resultado que dicho extracto tiene sensibilidad nula (-) para la mayor parte de las concentraciones evaluadas, y sensibilidad límite (sensibilidad: +) para la máxima concentración del extracto (100 %) sobre el crecimiento, de la

bacteria *Porphyromonas gingivalis*. Además, se determinó la concentración mínima del extracto, capaz de inhibir el crecimiento de dicha bacteria, el valor fue de 6,25 %³.

Ramos PD. y cols. 2011. Realizaron un artículo de revisión sobre el bacilo anaerobio Gram negativo, *Porphyromonas gingivalis*, el cual es predominante en la Periodontitis crónica, siendo la gingipaina su mayor factor de virulencia. Detallaron que su predominancia ha sido considerada como un factor de riesgos para enfermedades sistémicas inflamatorias, muy mortales, como la del infarto de miocardio. Aunque su susceptibilidad a una diversidad de fármacos hace posible su manejo con antimicrobianos previa remoción mecánica del biofilm subgingival.³⁶.

Rojas SR. 2011. Realizó un estudio experimental para determinar el efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum lambran* en el tratamiento contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, se encontró que existe un efecto antimicrobiano positivo en las concentraciones de 1000 y 1500 µg/ 20 µl de dicho extracto en el tratamiento de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Además que a mayor concentración del extracto de *Erythroxylum lambran*, habrá mayor efecto antibacteriano²³.

Moromi NH. Y COLS. 2009. Realizaron una revisión bibliográfica de diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en la Facultad de Odontología de UNMSM, concluyéndose que hay evidencias del efecto antibacteriano de los principios naturales de Extracto de *Erythroxylum coca novogranatense*, *Propóleo*, *Camellia sinensis*, *Minthostachys mollis* y *Croton lachleri*, frente a microorganismos presentes en flora bucal¹.

Ventura G. y cols. 2009. Obtuvieron aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam. var, a partir de hojas de coca provenientes de Quillabamba, región Cusco, tratadas con un sistema de destilación por arrastre con vapor de agua. Para así determinar su composición química por Cromatografía de gases / Espectometría de masas. Así mismo, determinaron la actividad antibacteriana, in vitro, utilizando el método de excavación placa cultivo a 10 y 50% de concentración. Se obtuvo que dicho aceite esencial presentó mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* que frente a cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomona aeruginosa*²².

Briceño CE. y cols. 2009. Detallan las especies del género *Prevotella*, las cuales están implicadas en mayor o menor grado en causar daños a nivel del periodonto; y que han sido reclasificadas recientemente, así como la detección e identificación de nuevas especies, como *P. marshii* y *P. baroniae* las cuales presentan similitudes con otras especies del género *Prevotella*, al comparar sus secuencias del ARNr entre sí; estas especies son sacaraolíticas y presentan variabilidad en la producción de ácido acético y ácido succínico. Todo esto es importante con el fin de aplicar el tratamiento antimicrobiano más adecuado y garantizar resultados exitosos luego de la implementación del mismo²⁹.

Minaya FP. 2008. Realizó un estudio in vitro para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, obtenido por la técnica de maceración alcohólica. Se determinó que dicho extracto tuvo una mayor actividad antibacteriana que el alcohol al 96%⁸.

Castro LA. 2008. Realizó un estudio experimental, donde se determinó que la composición química del aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense*, ejerce un prometedor efecto como un antioxidante natural y como un agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*. Esto se evaluó *in vitro*, utilizando el método de difusión en agar, demostrando actividad significativa frente a *Streptococcus mutans* cepa clínica en concentraciones de 100% y 50 %¹⁴.

Borrovic RF. 2006. Realizó un estudio experimental, para determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum coca* sobre flora mixta oral, determinó que sí existe un efecto antimicrobiano positivo a las concentraciones de 250, 500, 1000 y 1500 ug/ 20 ul de dicho extracto frente a los cultivos de flora mixta salival. Además se encontró que a mayor concentración del extracto, mayor es el efecto antimicrobiano obtenido⁷.

Guillarte C. y cols. 2005. En su revisión bibliográfica describen las características de las bacterias anaerobias gram negativas: principalmente *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Fusobacterium*, el rol que juegan estos microorganismos en la enfermedad periodontal, factores de virulencia, además detallan la capacidad que presentan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Prevotella melaninogénica* y *Capnocytophaga*, de producir proteasas que degradan inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) producidas por el hospedero, las cuales operan para facilitar la fagocitosis de las bacterias o para bloquear la adherencia fijándose a la superficie de la célula bacteriana²⁵.

Pfau E. et al. 2005. Evaluaron la colonización y susceptibilidad antimicrobiana de *P. intermedia* y *P. gingivalis*, en un estudio clínico realizado con 30 pacientes, para lo cual tomaron muestras del surco periimplantario y surco gingival, en tres momentos diferentes: en el momento de la cirugía, 20 y 60 días después de la colocación del implante. La susceptibilidad antimicrobiana se determinó mediante el uso de un método de dilución en agar. Se aislaron 19 *P. intermedia* (cuatro procedentes de surco periimplantario y 15 del surco gingival), y sólo siete *P. gingivalis* de surco gingival. El 65 % de las cepas de *P. intermedia* presentaron resistencia a la azitromicina, plomo, plata, cobre, titanio, zinc, aluminio y cloruro de mercurio³⁷.

Cabrera YM. 2004. Realizó un estudio con 138 pacientes mujeres gestantes atendidas en el servicio de Odontoestomatología, a las cuales se les tomó muestras del fluido crevicular del surco gingival, además se realizó y registró el Índice de Placa Bacteriana para medir el grado de higiene oral, encontrando que existe una relación entre la higiene oral (Buena, Regular o Mala) con la presencia de la bacteria *Prevotella Intermedia*; a BUENA higiene, el crecimiento bacteriano fue ESCASO (80% de gestantes). Pero ante higiene REGULAR o MALA, el crecimiento bacteriano fue MODERADO Y ABUNDANTE³⁰.

Mombelli A. et al. 1991. Realizaron un estudio experimental en 10 pacientes con enfermedad periodontal, a los que se les tomó muestras clínicas subgingivales de diferentes áreas de piezas pre molares, molares e incisivos, con la finalidad de determinar la composición microbiana y la distribución de estas bacterias Gram negativa negro Pigmentantes. En todas las muestras se aisló *P. Intermedia* y *P. melanigogénica*: pero *P. gingivalis* solo en 7 pacientes. Se determinó que a una localización más posterior, existe mayor prevalencia de bacterias negro Pigmentantes, además éstas aumentan en número a mayor profundidad de la bolsa periodontal²⁶.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1 ANTIBACTERIANOS NATURALES

Paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por la medicina natural, para estudiar el principio activo de sustancias naturales, especialmente aquellas que contienen polifenoles, para así determinar si poseen propiedades farmacológicas con efecto antibacteriano ⁽¹⁾.

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades, muchas de las especies empleadas por sus virtudes curativas entre los antiguos Egipcios, Griegos y Romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, la que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo ⁽²⁾.

Se debe destacar que los fármacos a base de derivados de productos naturales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse biológicamente entre sí, de forma tal que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados ⁽³⁾⁽⁴⁾.

La Fitoterapia, nombre que recibe el “uso medicinal de plantas”, sigue hoy en día vigente, y gracias a los proyectos científicos se sigue descubriendo nuevas propiedades de algunas especies no estudiadas previamente. En el área odontológica, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de plantas con el objeto de ayudar en el control de la placa bacteriana, y por consiguiente, en la disminución de la incidencia de caries dental y enfermedad periodontal ^(3,5,6).

La actividad antimicrobiana de sustancias frente a un microorganismo dado se puede evaluar a través de métodos cualitativos y cuantitativos, dentro de estos últimos tenemos la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que consiste en establecer la menor concentración de algún compuesto o antibiótico capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo, esto se puede realizar mediante varias técnicas, una de ellas es la Técnica de Dilución en Medio Líquido ⁽²⁾.

2.2.2 HOJA DE COCA (*Erythroxylum coca*)

2.2.2.1 GENERALIDADES

Etimológicamente la palabra coca proviene del quechua “kuka” o “koka”, que debe de interpretarse según Stomi, “ku” o “ko”: parte más destacada o principal de algo, “ka” o “kau”: vivificante, que da vida, vigorosa y fuerte ⁽⁷⁾.

La hoja de coca es un elemento básico en las comunidades andinas, es tradicional y la más importante. Todos los actos y costumbres de las personas andinas están ligados íntimamente a la coca, esencial en la práctica de medicina, actos religiosos, sociales, económicos, políticos, familiares y cotidianos. Consumida por los aborígenes de los Andes, la coca viene a ser desde tiempos remotos, un elemento insustituible de sus vidas. El masticado o “picchado” de las hojas de coca es muy habitual en los Andes, la cantidad y frecuencia del consumo de la coca está en relación directa con la clase de actividad desarrollada, que por lo regular es constante y diaria ⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

La hoja de coca ha sido parte sustancial de las culturas originarias y su aparición se remonta a 300 años a.c. Las evidencias históricas

demuestran que la hoja de coca es usada desde hace milenios en las culturas andinas (preincaicas e incaicas) y desde hace siglos por las culturas amazónicas y guaraníes⁽¹⁰⁾. Es un componente indispensable hasta hoy, del culto religioso. En el Perú, se consumen alrededor de seis a ocho millones de kilogramos de coca cada año. El consumidor promedio toma alrededor de 30 g diarios, aunque algunos individuos pueden consumir hasta 200 g al día⁽¹¹⁾. Así mismo, la coca tiene usos en el ámbito internacional, como por ejemplo en la fabricación de anestésicos o la utilización del extracto de sus hojas como parte de los ingredientes de una bebida gaseosa líder en el mundo⁽³⁾.

2.2.2.2 BOTÁNICA

El género *Erythroxylum* está conformado por unas 250 especies, de las cuales 200 especies corresponden a la zona tropical de Sudamérica principalmente en el Perú y Bolivia y en menor escala en Colombia, Ecuador, Venezuela y Brasil. A menos de 1000 metros de altitud crecen las especies silvestres y las cultivadas a 2000 metros de altura⁽⁵⁾. En el Perú se cultivan en las cuencas del Río Marañón, Huallaga, Paucartambo, Apurímac, Ene, Ucayali y los valles interandinos de La Libertad, Huánuco, Cajamarca, Ayacucho, Amazonas, San Martín, Loreto y Cusco⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

La planta de hoja de coca es un arbusto que crece de cinco a diez pies de altura, con ciertas características botánicas muy particulares. Las hojas tienen líneas aeroladas longitudinales muy claras que se curvan hacia la vena central y que es un engrosamiento de la epidermis, resultando un enrollado de la hoja. En la base del peciolo tiene unas estípulas ovaladas intrapeciolares características. Las flores de un blanco cremoso, miden más o menos un centímetro, y

tienen cinco sépalos y cinco pétalos. Cuando el fruto madura, dos de sus óvulos abortan, y los lóculos son destruidos. El fruto es una drupa roja, ovalada con una sola semilla ⁽³⁾.

2.2.2.3 USO EN LA MEDICINA TRADICIONAL

El uso de la hoja de coca data de tiempos muy antiguos, los Incas la llamaban “hoja sagrada” por sus virtudes curativas. Los pobladores de la región andina del Perú la siguen utilizando ya sea masticándola, en infusión, mate, emplastos, y cataplasmas ⁽¹⁴⁾.

Existen preparaciones galénicas oficiales a base de las hojas de coca como mate de coca, polvo, tintura y extracto fluido. Por su contenido de cocaína tiene efecto fármacodinámico, terapéutico y tóxico⁽¹³⁾; también tiene propiedad anestésica y antidepresiva; haciendo énfasis que bajo la forma de hoja de coca, ésta no produce toxicidad o dependencia. Tiene propiedad nutritiva por la presencia de vitamina A, complejo B y vitamina E, como también presencia de nutrientes tales como calcio, hierro, zinc, magnesio, potasio, etc. ⁽¹⁵⁾

Brack A. ⁽¹⁶⁾, nos ofrece una síntesis del uso de la hoja de coca en la medicina tradicional:

- Como analgésico gástrico y anorético: picchado o infusión.
- Contra el dolor
- Contra picaduras de arácnidos e insectos: hojas machacadas o del picchado.
- Estomacal y carminativa: infusión de las hojas.
- Cansancio y fatiga: infusión de las hojas.
- Digestivo: infusión de las hojas.

- Dolor de muelas: enjuague con la cocción, masticar las hojas.
(17)
- Asma: tomar el cocimiento de las hojas.
- Antioxidante⁽¹⁸⁾
- Efecto coagulante⁽¹⁹⁾
- Tratamiento anemia ferropénica⁽²⁰⁾
- Control de glucosa post-ingesta⁽²¹⁾

Así mismo se usa en gárgaras para aliviar el dolor de garganta y la ronquera, en forma de emplastos por su acción analgésica en heridas y quemaduras, además por la acción de los taninos contribuye a la cicatrización y a la protección antiséptica.

2.2.2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los componentes químicos de la hoja de coca en cultivo no son uniformes, dependiendo de factores intrínsecos entre los que están la edad de la planta, la identidad de las variedades, el estado de las hojas y como factores extrínsecos las zonas geográficas, la forma de cultivo y el medio ambiente principalmente. La hoja de coca contiene metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos y lípidos; y metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, glicósidos y aceite esencial. Los componentes principales son los alcaloides, destacándose entre ellos la cocaína⁽¹⁵⁾⁽²²⁾.

Estudio de la Universidad de Harvard en 1975, realizado por Duke, Aulik y Powman, confirmaron el valor nutritivo y medicinal de la hoja de coca y su extracto. Además, estudios del Instituto de Nutrición del Ministerio de Salud y el Instituto de Nutrición de la Universidad Cayetano Heredia del Perú en 1982, confirman el valor nutricional de la hoja de coca y de su extracto realizados anteriormente⁽³⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL EXTRACTO DE HOJA DE COCA (100 mg)²

Calorías 305	Niacina 3.73 mg
Agua 8.5 g	Vitamina C 1.40 mg
Proteína 18.8 g	Vitamina E 43.5 UI
Grasa 3.3 g	Vitamina B5 0.308 mg
Carbohidratos 44.3 g	Vitamina B12 1.05 mg
Fibra 133 g	Ácido fólico 0.1 g
Calcio 1790 mg	Biotina 0.09 mg
Alcaloides 0.5-1.5 %	Ácido pantoténico 0.68 mg
Fósforo 637 mg	Yodo 5.0 mg
Hierro 26.9 mg	Magnesio 213.0 mg
Vitamina A 10,999 UI	Zinc 2.7 mg
Tiamina B1 0.58 mg	Cobre 1.21 mg
Ribofavina B2 1.33 mg	Sodio 40.6 mg

ALCALOIDES DE LA HOJA DE COCA

Cocaína	Cinamoilecnonina (cis y trans)
Egnoninatropacocaína	Tropan 3-al
Tropan 3b-ol	Tropan 3a-6b-diol
Metilegnonina	3a- benzoil oxitropano
a-truxilina	b-higrina
higrina	higrolina
cuscohigrina	nicotina

2.2.3 BACILOS NEGRO PIGMENTANTES

Grupo de Bacterias bacilares, anaerobias estrictas, Gram negativa, cuyo hábitat primario es el fondo de las bolsas periodontales ⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾. Están fuertemente relacionadas, según estudios previos, con el desarrollo de enfermedades periodontales (Periodontitis)⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾. Principalmente comprende los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Fusobacterium*⁽²⁸⁾, los cuales están clasificados dentro de la familia Bacteroidaceae, según el Manual de Bacteriología Sistémica de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) ⁽²⁹⁾. Se ha comprobado que a una localización más posterior, existe mayor prevalencia de BNP, además éstas aumentan en número a mayor profundidad de la bolsa periodontal. ⁽²⁶⁾

En estudios sobre alteraciones hormonales y composiciones microbianas en pacientes Gestantes, se mencionan las Bacterias Negro Pigmentantes como las especies que sufren un incremento en el fluido crevicular, específicamente *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*, debido a que las hormonas sexuales femeninas (Progesterona y Estradiol) estarían aumentadas en el fluido crevicular y éstas serían fuente de nutrientes para dichas bacterias ⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾.

2.2.3.1 CULTIVO

Al ser un grupo de bacterias anaerobias estrictas, su aislamiento es a partir de muestra de biofilm subgingival, que se toma con conos de papel (número 30 ó 40), que se colocan dentro del surco o bolsa periodontal, por 60 seg, para luego ser llevado a un medio de transporte como BHI (Brain Heart Infusion) o Tioglicolato, y luego ser sembrado en medios enriquecidos como Agar sangre suplementado con hemina y vitamina K o el medio selectivo Agar Columbia antibiótico, e incubado a 37 °C por 7 a 14 días, en condiciones de anaerobiosis, habitualmente se utiliza una mezcla de gases que contiene 10% de H₂, 5-10 de CO₂ y un equilibrio de

N₂. Esto se puede lograr mediante el uso de una Jarra, cámara o sobres de anaerobiosis.

Pasado este tiempo, la lectura de las colonias debe reconocer características como; tamaño de 1-2 mm, forma redonda, convexa y ser pigmentados de un color marrón a negro. La coloración Gram debe evidenciar una morfología cocobacilar de 0.5x1-2 μ m y ser negativa, es decir mostrar una coloración rosa o fucsia. Para la identificación final de alguna cepa en especial, es decir *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, se puede utilizar, un kit de pruebas bioquímicas específicas, la prueba BANA: Benzoil DL-Arginina-Naftilamida, los test serológicos tipo ELISA y la prueba de fluorescencia negativa con Luz Ultravioleta. Las pruebas con base en la biología molecular como PCR (reacción en cadena de polimerasa), son muy utilizados en la actualidad por su alto porcentaje de especificidad y sensibilidad ⁽³¹⁾.

2.2.3.2 FAMILIA BACTEROIDACEAE

En el pasado existía una pobre definición del género Bacteroidaceae, y más de 50 especies estaban incluidas en el mismo, tal y como se refiere en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). Posteriormente se propuso una reclasificación del Género Bacteroides entre estas, dos nuevos Géneros: ***Porphyromonas***, que incluía aquellas especies asacarolíticas de Bacteroides, así como las especies productoras de pigmento; y ***Prevotella***, que incluía las especies moderadamente sacarolíticas, todas estas predominantes en cavidad bucal. Los Bacteroides son prevalentes entre la flora de membranas mucosas de humanos y animales. Estos microorganismos constituyen 2/3 del total de anaerobios aislados de especies clínicas ⁽²⁵⁾.

2.2.3.3 GÉNERO PREVOTELLA

Las especies del género *Prevotella* se caracterizan por ser bacterias con forma de bacilos anaerobios estrictos, no esporulados e inmóviles, algunos productores de pigmento marrón o negro, lo cual hace que se clasifiquen como pigmentadas y no pigmentadas ⁽²⁵⁾⁽²⁹⁾. Estas se han relacionado con el desarrollo de abscesos cerebrales y pulmonares, empiema, enfermedad inflamatoria pélvica y abscesos tubo-ováricos⁽³⁰⁾.

Algunos mecanismos de virulencia de estos microorganismos son: la presencia de fimbrias, encargadas de proveer poder adhesivo al microorganismo, interviniendo en el proceso de adhesión, agregación y congregación; la presencia de adhesinas, moléculas que interactúan con un receptor proteico o polisacárido ubicado en otra bacteria, otras adhesinas como residuos proteicos y glucoproteicos superficiales⁽³²⁾⁽³³⁾; la capacidad para degradar inmunoglobulinas, acción tóxica sobre los fibroblastos, y actividad fibrinolítica e inhibición de células B, entre otros⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾.

Las especies residentes en cavidad bucal son consideradas en su mayoría como microorganismos periodontopatógenos, a través de procesos de sinergia con otros microorganismos. Son de crecimiento exigente y requieren de vitamina K, hemina o sangre; su hábitat primario es el surco gingival, y se han asociado con casos de Periodontitis, infecciones de los conductos radiculares y abscesos de origen dentario y periodontal ⁽²⁹⁾. En este género se incluyen *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *P. melaninogénica* ⁽³⁴⁾.

2.2.3.3.1 PREVOTELLA INTERMEDIA

Especie del género *Prevotella*, del grupo de las *Prevotella* pigmentadas. Son bacterias anaerobias Gram (-), que a menudo se observan al microscopio como cocobacilos o bastones alargados ⁽²⁵⁾. No son formadores de esporas, pero sí producen pigmentos negruzcos. Esta bacteria tiene enzimas protectoras contra el oxígeno como la Superóxido Dismutasa y la Peroxidasa ⁽³⁰⁾.

Recibe considerable atención en relación a la patogénesis de las enfermedades periodontales destructivas. La enzima proteasa que elabora, la hace una de las bacterias proteolíticas más comunes en pacientes con Periodontitis ⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾. Se ha demostrado una correlación importante entre la presencia de *Prevotella intermedia* con la inflamación y la profundidad de bolsas periodontales. Esta bacteria coloniza ante todo el surco gingival, además se asocia con diferentes infecciones periodontales y endodónticas. Los niveles de *Prevotella Intermedia* se han mostrado particularmente elevados en gingivitis ulcerativa necrotizante aguda (GUNA).

Además, mediante estudios previos realizados, se ha demostrado la relación entre *Prevotella intermedia* y el periodo de Gestación, siendo esta bacteria la más frecuente y la que mayor incremento presenta seguido por *Porphyromonas gingivalis*, en menor proporción ⁽²⁸⁾. Este aumento se da por el estímulo producido por las hormonas esteroideas: progesterona y estradiol, que actúan como sustitutos ideales de Vitamina K y naftoquinona, los cuales constituyen nutrientes esenciales para especies como *Prevotella Intermedia* ⁽³²⁾⁽³⁴⁾.

2.2.3.4 GÉNERO PORPHYROMONAS

Se caracterizan por ser bacilos pleomórficos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados. Carecen de metabolismo fermentativo, por lo que son llamadas asacarolíticas, utilizan sustratos nitrogenados como fuente de energía, no se desarrollan en presencia de bilis y son sensibles a la Vancomicina. Actualmente el Género Porphyromonas comprende doce especies, pero solo tres se han aislado de la cavidad bucal humana: ***P. gingivalis***, ***P. endodontalis*** y ***P. asaccharolytica***. Estas especies se caracterizan, además, por producir un pigmento negro en sus colonias, característica que se observa en medios de cultivo que contienen sangre lisada, hemina y vitamina K ⁽²⁵⁾.

2.2.3.4.1 PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 – 0.8 mm x 1.35 um, Gram negativo, anaerobio estricto, considerado como colonizador secundario y comensal en la cavidad oral. Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos ⁽³¹⁾.

Este microorganismo es un importante miembro de la microbiota periodontal, involucrado tanto en la progresión de la Periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido circundante. Porphyromonas gingivalis es comúnmente detectada en pacientes jóvenes con gingivitis, y pacientes adultos con periodontitis, o tratamiento con implantes dentales, usando métodos inmunológicos y de biología molecular como la Reacción en cadena de Polimerasa (PCR) ⁽³⁷⁾. También se ha encontrado en placas supragingivales maduras de pacientes jóvenes con o sin destrucción periodontal, sugiriendo que es un patógeno

de tipo oportunista. Al ser una especie proteolítica, asacarolítica, anaerobia estricta, coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja⁽³⁸⁾, pero en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno. El ecosistema subgingival proporciona un medioambiente ideal para esta especie, ya que, el potencial redox es bajo (y más bajo aun en sacos periodontales), y posee nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos⁽³⁾.

Esta bacteria requiere obligatoriamente hierro para crecer; sin embargo, cuando ocurre una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (sideporos) utiliza hemina (hierro protoporfirina IX). La hemina que se acumula en la membrana extracelular actúa como "basurero" de oxígeno ayudando a mantener un microambiente anaerobio. Los niveles de hemina en boca son variables y el sangrado, como resultado de la inflamación gingival, elevaría su concentración subgingival, de modo que este puede ser un factor que predispone a la acumulación de esta bacteria.

Como factores de virulencia, se pueden citar: las fimbrias, la cápsula, la endotoxina, la hemaglutinina (aglutina glóbulos rojos para obtener de ellos hemina, el cual es un factor de crecimiento), colagenasas, inmunoglobulinasas, queratinasas, complementasas, condroitinsulfatasas, fosfolipasas A, y otras enzimas líticas, factor degradador del fibrinógeno, y otros. Las evidencias científicas indican que los Lipopolisacáridos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente su lípido A, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del huésped indirectamente a través de la producción de citokinas⁽³⁹⁾; además, se ha demostrado que LPS de esta especie induce la producción de IL-6 e IL-8 desde fibroblastos del ligamento periodontal en humanos⁽³⁾.

2.2.4 TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

Se basa en el control y remoción del Biofilm supra y subgingival⁽³⁹⁾, por medio de la fase I del tratamiento periodontal, recomendando la remoción en una o más cita. A su vez se indica la mejora de la fisioterapia del paciente, a un nivel de control del índice de higiene oral a 20 %⁽³¹⁾⁽³⁾.

Otro elemento que puede ayudar a mejorar el tratamiento es el uso de antimicrobianos, ya sea:

Locales como el uso de colutorios a base de clorhexidina al 0.12 %, aplicado 2 veces por día por un periodo de 10 a 14 días.

Sistémicos, entre la gran variedad de antibióticos utilizados actualmente, se han obtenido algunas buenas respuestas terapéuticas con amoxicilina/ácido clavulánico, metronidazol, clindamicina y las combinaciones de metronidazol más amoxicilina y metronidazol más amoxicilina/ácido clavulánico. Aproximadamente entre el 30 y el 85 % de las cepas de *Prevotella Intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* son productoras de betalactamasas⁽⁴¹⁾, lo que conlleva resistencia a Penicilina y a Amoxicilina, pero no a amoxicilina/ácido clavulánico ni a otros betalactámicos estables a la acción de estas betalactamasas.

La prevalencia de resistencia a tetraciclinas y macrólidos se sitúa en torno al 30-50 % y 80-95 % respectivamente, siendo Azitromicina en general el macrólido más activo frente a bacilos gramnegativos anaerobios. El 5 - 25 % de las cepas son resistentes a clindamicina y menos del 5 % a Metronidazol⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾.

El antimicrobiano ideal tendría las siguientes características: ⁽⁸⁾

- Debe eliminar rápidamente la placa organizada.
- Debe inhibir la formación de nueva placa
- No debe ser tóxico
- No debe de poseer efectos secundarios adversos
- Debe tener características organolépticas aceptables
- Debe poseer sustentividad
- No debe ser inactivado por productos de los microorganismos o el hospedero
- No debe originar resistencia bacteriana
- Debe alterar en forma mínima la microbiota asociada con la salud
- No debe ser carcinogénico

Es fundamental que todo tratamiento periodontal tenga una fase de mantenimiento periódico de cada 3 meses, para ver la evolución de la lesión y hacer monitoreo de los marcadores microbiológicos, ya que su presencia podría indicar riesgo de una posible recidiva de la patología⁽⁴³⁾.

2.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*?

2.4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existen especies bacterianas periodontopatógenas, que debido al mecanismo de producción de beta-lactamasa, generan resistencia antibiótica. Quedando así, sin efecto la terapia antibiótica convencional; además del alto costo y las reacciones secundarias que puede originar. Es por esto, que en los últimos años se ha dado énfasis al estudio de sustancias naturales, especialmente a aquellas que contienen polifenoles, y tienen la capacidad de presentar propiedades farmacológicas antibacterianas, como la Hoja de Coca. Hoy en día las sustancias derivadas de plantas constituyen aproximadamente el 25 % de las medicinas prescritas.

Además, a través de la determinación de la actividad antimicrobiana de la hoja de *Erythroxylum Coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes* (BNP), se puede determinar si ésta sería útil para crear un producto que actúe como agente antiséptico.

2.5. OBJETIVOS

2.5.1. Objetivo General

Determinar si existe actividad antibacteriana, *in vitro*, del extracto de *Erythroxylum coca*, sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*.

2.5.2. Objetivos Específicos

- a. Determinar qué concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca* (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 %, 1,56 %, 0,78 %) presentan actividad antibacteriana frente al crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes.
- b. Identificar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de *Erythroxylum coca* sobre el crecimiento bacteriano de Bacilos Negro Pigmentantes.

2.6. HIPÓTESIS

Hipótesis general

Sí existe actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre Bacilos Negro Pigmentantes.

Hipótesis de trabajo

A mayor concentración del extracto de *Erythroxylum coca*, mayor será la actividad antibacteriana frente al crecimiento bacteriano de Bacilos Negro Pigmentantes.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es de tipo:

- Experimental → se evaluó el efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum coca* frente a *Bacilos Negros Pigmentantes*.
- Prospectivo → los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* frente a *Bacilos Negro Pigmentantes* fueron registrados a medida que ocurrieron, con controles a 05 días (Test de dilución en medio líquido), y 07 – 14 días (Test de difusión en Agar)
- In vitro → se realizó la prueba en laboratorio.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN

Bacterias periodontopatógenas Gram negativas.

MUESTRA

Tipo de muestreo

No probabilístico intencional, pues antes de incluir a las cepas en el estudio, se determinó si cumplían con los criterios de inclusión.

Unidad de muestra

Placa dental subgingival

Unidad de análisis

Conformada por los Bacilos negro pigmentantes, sometidos a las pruebas de sensibilidad por Difusión en Agar con discos y Dilución en medio líquido.

Criterios de inclusión

- Bacterias periodontopatógenas Gram (-)
- Bacterias anaerobias estrictas
- Bacterias negro Pigmentantes
- Bacterias forma bacilar

Criterios de exclusión

- Bacterias que no muestren potencial de crecimiento (+) luego del cultivo en el medio anaerobio.
- Bacterias que no muestren pigmentos de color negro luego del cultivo.

3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**VARIABLE INDEPENDIENTE**

- Extracto de *Erythroxylum coca*

VARIABLE DEPENDIENTE

- Sensibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes (BNP) frente al extracto de *Erythroxylum coca*

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA	VALOR
EXTRACTO DE ERYTHROXYLUM COCA	Sustancia hidroalcohólica que contiene el extracto de Erythroxylum coca	Antibacteriana	Concentración	Cuantitativa	0.78%
					1.56%
					3.13%
					6.25%
					12.5%
					25%
					50%
					100%

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 RECURSOS

RECURSOS HUMANOS

- Asesor del trabajo de Investigación
- Odontólogos y biólogos que laboran en el Servicio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM
- Personal de apoyo en el Servicio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM
- Personal para el manejo estadístico
- Digitador del trabajo de investigación

RECURSOS MATERIALES

Infraestructura

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM
- Laboratorio del Área de Control de Calidad y Desarrollo e Investigación de la Empresa nacional de la coca S.A (ENACO S.A).

Materiales

- Materiales para la recolección de la muestra: conos de papel, algodón, pinza, espejos intraorales, sonda periodontal, guantes, mascarilla.
- Materiales de laboratorio para crear un ambiente anaerobio: jarra de anaerobiosis, sobres generadores de anaerobiosis (ANAEROCULT A^R) y agua destilada.
- Materiales de laboratorio para crear los medios de cultivo: Agar Schadler enriquecido con sangre de cordero, Caldo BHI, placas Petri y tubos de ensayo.
- Materiales para pruebas de la actividad antibacteriana: Extracto de Hoja de Coca, Cultivo puro de Bacilos Negro Pigmentantes, Agar Schadler, Caldo BHI, medio anaerobio, Vortex, estufa, incubadora, discos de papel para prueba de difusión, micro pipetas, tips, mecheros, pinzas, algodón, Asa de siembra, espátula Digralski, Alcohol 96°, Clorhexidina 0.12%, guantes y mascarillas.
- Fichas para la recolección de datos: registro de la lectura de los halos de inhibición y registro de datos para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) (ANEXO 9.1)
- Computadora Intel Core i3
- Software de cómputo para diseño estadístico

3.4.2 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICA

Obtención del Extracto de *Erythroxylum coca*

El extracto de *Erythroxylum coca* fue obtenido de la Empresa Nacional de la Coca (ENACO S.A.), y posteriormente diluido con alcohol etílico 96° hasta obtener soluciones de 0.78 %, 1.56 %, 3.13 %, 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 % y 100 %. Dichas diluciones fueron conservadas en frascos de vidrio oscuro, a temperatura ambiente, sin exponerse al sol, como sugieren las Especificaciones técnicas del producto - Condiciones de almacenamiento. (ANEXO 9.1)

Obtención de Bacilos Negro Pigmentantes

Se trabajó con cultivos puros de *Bacilos Negro Pigmentantes*, obtenidos de muestras de bolsas periodontales de pacientes con Enfermedad Periodontal atendidos en la Facultad de Odontología de la UNMSM.

Las muestras fueron tomadas con conos de papel número 30 ó 40, los cuales se introdujeron en la bolsa periodontal de la pieza seleccionada, previo sondaje, por un tiempo aproximado de 60 segundos, quedando así el cono embebido, posteriormente se los introdujo en el medio de transporte, BHI (Brain Heart Infussion). Para el transporte se utilizó tubos sellados de dicho medio, luego de estos se tomó una alícuota y se sembró en placas Petri que contenían el medio de Agar Sangre Suplementado al 5 % (Agar Schaedler) y se llevó a incubar en un sistema Generador de Anaerobiosis por 7 - 14 días, a 37 °C, hasta observar el crecimiento de las colonias. De estas colonias fueron aisladas en nuevas placas aquellas que presentaron las siguientes características: colonias circulares, convexas, de tamaño aproximado de 0.5 - 2 mm, lisas y pigmentadas de color oscuro, gram (-),

para su posterior siembra para purificar la muestra; igualmente, se llevó a incubar en un sistema Generador de Anaerobiosis por 7 - 14 días, a 37 °C, hasta observar el crecimiento de las colonias. Este procedimiento se conoce como “resiembra”.

Creación del ambiente anaerobio

Se agregó uniformemente 35 mL de agua destilada sobre una lámina de ANAEROCULT A^R, inmediatamente después se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis y se cerró herméticamente.

Prueba de la actividad antibacteriana

Se llevó a cabo mediante el Test de difusión en Agar con discos

Primero, se procedió a tomar algunas colonias de *Bacilos Negro Pigmentantes* del cultivo que previamente se había realizado, y se las suspendió en un Caldo de BHI (Brain Heart Infusion), obteniendo una turbidez final de 0.5 en la escala de Mc Farland, que equivale a 0.5×10^8 UFC/ml.

Se diluyó proporcionalmente el extracto de *Erythroxylum coca* (con alcohol etílico 96°) en 08 concentraciones (1/1, 1/2, 1/4, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) y se agregaron 20 uL de estas concentraciones, a los discos de papel de filtro, para su posterior colocación de forma ordenada según su concentración, sobre el Agar Schadler

Se realizó un test de difusión con discos en Agar Schadler, para ello, previamente se realizó el sembrado de las alícuotas bacterianas mediante la técnica por diseminación sobre dicho medio. Se realizó por quintuplicado el Test de difusión en Agar, cada uno de los cuales contenía 10 discos: 08 discos que portaban las ocho diferentes concentraciones del extracto, 01

disco conteniendo Clorhexidina 0.12 % (control positivo) y otro conteniendo alcohol etílico 96° (control negativo); distribuidos equidistantes sobre el Agar Schadler previamente sembrado con los Bacilos Negro Pigmentantes.

Cada placa fue incubada por 7 - 14 días, a 37 °C, en un ambiente anaerobio. Luego del tiempo indicado, se procedió a la medición de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en cada placa, utilizando para ello un calibrador pie de rey. Se ordenaron los resultados y se registraron.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se llevó a cabo mediante un Test de Dilución en medio líquido, para lo cual se preparó 10 tubos de ensayo, cada uno conteniendo 2.8ml de un medio de cultivo BHI.

A cada tubo de ensayo se agregó 100 uL del inóculo bacteriano (*Bacilos Negro Pigmentantes*), además 100 uL del extracto de *Erythroxylum coca* al 0.78 %, 1.56 %, 3.13 %, 6.25 %, 12.5 %, 25 %, 50 % y 100 % en forma correspondiente, además 100 uL de Clorhexidina 0.12% (control positivo) y 100 uL de alcohol etílico 96° (control negativo).

Todo este procedimiento se realizó por quintuplicado, y se incubó por 48 horas en un ambiente anaeróbico.

En cada grupo se evaluaron los 10 tubos, observando el crecimiento bacteriano y se determinó la concentración mínima del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Cuando esta lectura pasaba de un crecimiento (turbidez) a otro con ausencia de crecimiento (claro), esto representó la CMI.

3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS

Recolección de Datos

Se utilizó una ficha de recolección de datos que fue llenada por el investigador (ANEXO 7.1 y 7.2), luego se organizaron los datos en tablas y gráficas.

3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El procesamiento se realizó con una computadora Intel Core i3, sistema operativo Windows 8 Pro, con el programa SPSS versión 21. Los datos fueron procesados aplicándose los intervalos de confianza al 95 %, para determinar el nivel de significancia de los resultados ($p < 0.05$), se utilizaron las Pruebas de U Mann Whitney y Kruskal Wallis.

La significancia de la presencia o ausencia del crecimiento de los *Bacilos Negro Pigmentantes*, frente a las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca* estudiadas, se realizó mediante un análisis estadístico de regresión lineal y correlación de Pearson⁽⁴⁴⁾, en la cual el crecimiento de los aislados de los *Bacilos Negro Pigmentantes* y la concentración del extracto *Erythroxylum coca*, corresponden a la variable dependiente e independiente respectivamente.

IV. RESULTADOS

Los resultados fueron clasificados según las concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*.

Los exámenes de difusión en Agar y el de dilución en medio líquido, nos permiten la evaluación del efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca* sobre Bacterias Negro Pigmentantes, respectivamente.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
DE *Erythroxylum coca* SOBRE *Bacilos Negro Pigmentantes* MEDIANTE**

EL TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR

TABLA 1: Halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* según las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

HALOS	Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>									
	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%	C (-)	C (+)
	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%
5 mm	5 100%	5 100%	1 20%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	2 40%	0 0%
6 mm	0 0%	0 0%	4 80%	1 20%	0 0%	3 60%	2 40%	0 0%	3 60%	0 0%
7 mm	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	2 40%	1 20%	1 20%	0 0%	0 0%
8 mm	0 0%	0 0%	0 0%	4 80%	2 40%	0 0%	2 40%	1 20%	0 0%	0 0%
9 mm	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	1 20%	0 0%	0 0%	2 40%	0 0%	0 0%
10 mm	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	2 40%	0 0%	0 0%	1 20%	0 0%	0 0%
12 mm	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	1 20%
14 mm	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	4 80%
Total	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%	5 100%
Media	5 mm	5 mm	5.8mm	7.6mm	9mm	6.4mm	7mm	8.6mm	5.6mm	13.6mm

Para las concentraciones 0,78 % y 1,56 % del extracto de *Erythroxylum coca*, los halos de inhibición del crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes, miden 5 mm (100 % de los casos) con una media de 5 mm. Para la concentración de 3,13 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 6 mm (80 % de los casos) con una media de 5,8 mm. Para la concentración de 6,25 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 8 mm (80 % de los casos) con una media de 7.6 mm. Para la concentración de 12,5 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 10 mm (40 % de los casos) con una media de 9 mm. Para la concentración de 25 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 7 mm (40 % de los casos) con una media de 6,4 mm. Para la concentración de 50 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 8 mm (40 % de los casos) con una media de 7 mm. Para la concentración de 100 %, se observa que los mayores halos de inhibición miden 10 mm (20 % de los casos) con una media de 8.6 mm.

Por su parte, para el grupo control negativo (Alcohol 96°) se observa que los mayores halos de inhibición miden 6 mm (60 % de los casos) con una media de 5,6 mm y para el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12 %), se observa que los mayores halos de inhibición miden 14 mm (en el 80 % de los casos) con una media de 13,8 mm.

TABLA 2: Actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*

Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>											
	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%	C (-)	C (+)	
HALOS											
	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%
S. nula:											
Menor	5	5	5	5	2	5	5	2	5	0	
8 mm	100%	100%	100%	100%	40%	100%	100%	40%	100%	0%	
S. límite:	0	0	0	0	3	0	0	3	0	5	
9-14mm	0%	0%	0%	0%	60%	0%	0%	60%	0%	100%	
S. media:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15-19mm	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
Sumamente sensible:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mayor a 20 mm	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Se observa que los halos de inhibición del crecimiento bacteriano en la mayoría de las concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca* evaluados (excepto en el 60 % de los casos del extracto al 12,5% y 100% respectivamente), no superaron los 8 mm; eso indica que poseen una actividad antibacteriana nula (sensibilidad nula).

Para la concentración del 12,5 % del extracto de *Erythroxylum coca*, en el 40 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* no superaron los 8 mm; y en el 60 % de los casos la longitud de los halos superaron los 9 mm, lo que indica una actividad antibacteriana límite (sensibilidad límite).

Para la concentración del 100 % del extracto de *Erythroxylum coca*, en el 40 % de los casos, los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* no superaron los 8 mm; y en el 60 % de los casos la longitud de los halos superaron los 9 mm, esto indica una actividad antibacteriana límite (sensibilidad límite).

Por tanto *Bacilos Negro Pigmentantes* solo presenta sensibilidad frente al extracto de *Erythroxylum coca* (sensibilidad límite) en el 60 % de los casos del extracto al 12,5% y 100 % de concentración.

TABLA 3: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 0,78% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 0.78%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	5 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	5 mm	5 mm	12 mm
Máximo	5 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	0	0.54	0.89

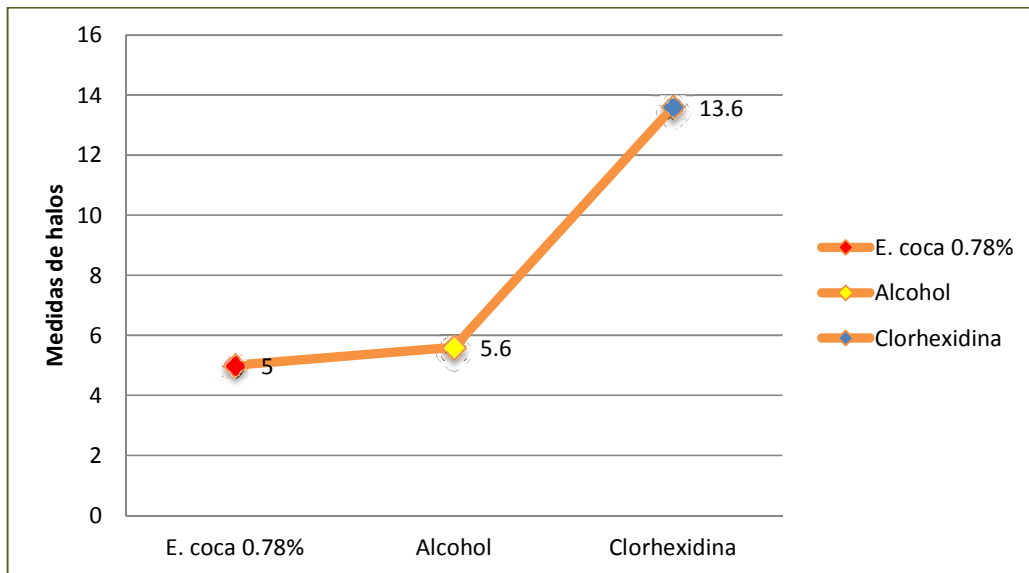
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 0,78 % del extracto de *Erythroxylum coca*, en todas las pruebas fue 5 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 5 mm.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 0,78 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 0,78 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 1: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 0,78 % de *Erythroxylum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de BNP frente a la concentración 0,78 % del extracto de *Erythroxylum coca* (5 mm), fue menor al valor de la media del control negativo (5,6 mm) y control positivo (13,6 mm).

TABLA 4: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 1,56% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 1.56%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	5 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	5 mm	5 mm	12 mm
Máximo	5 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	0	0.54	0.89

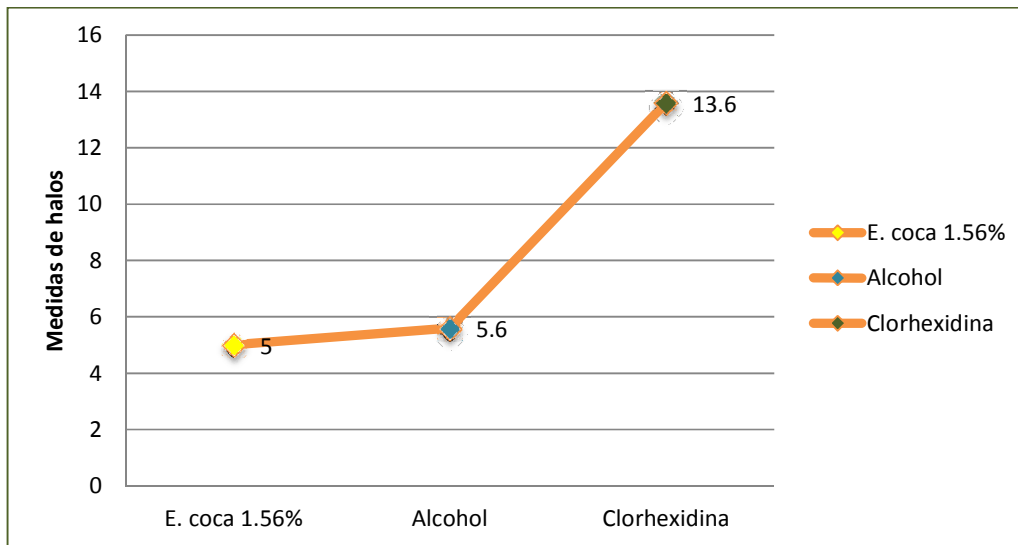
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 1,56 % del extracto de *Erythroxylum coca*, en todas las pruebas fue 5 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 5 mm.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 1,56 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 1,56 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0,12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

FIGURA 2: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 1,56 % de *Erythroxylum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de BNP frente a la concentración 1,56 % del extracto de *Erythroxylum coca* (5 mm), fue menor al valor de la media del control negativo (5,6 mm) y control positivo (13,6 mm).

TABLA 5: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 3,13% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 3.13%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	5.8 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	5 mm	5 mm	12 mm
Máximo	6 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	0.44	0.54	0.89

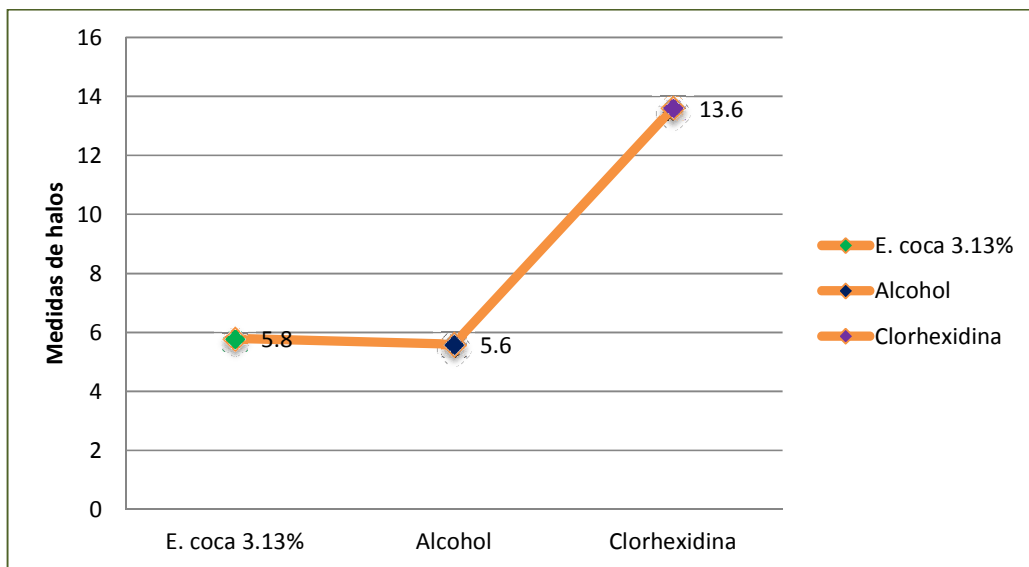
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 3,13 % del extracto de *Erythroxylum coca* fue 5,8 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 5 y 6 mm respectivamente.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5.6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 3,13 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 3,13 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 3: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 3,13 % de *Erythroxylum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 3,13 % del extracto de *Erythroxylum coca* (5,8 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

TABLA 6: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 6,25% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 6.25%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	7.6 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	6 mm	5 mm	12 mm
Máximo	8 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	0.89	0.54	0.89

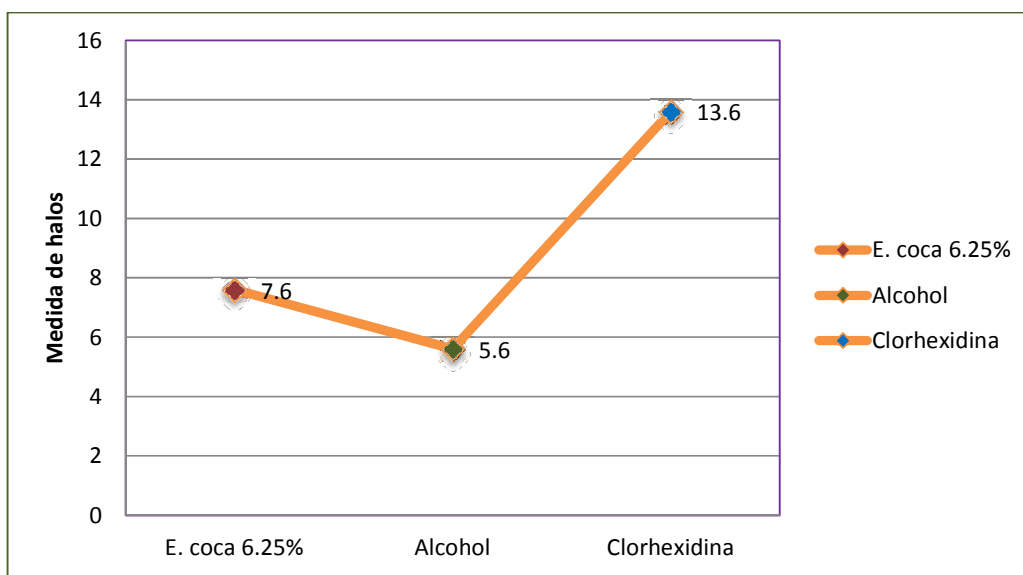
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 6,25 % del extracto de *Erythroxyllum coca* fue 7,6 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 6 y 8 mm respectivamente.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxyllum coca* 6,25 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxyllum coca* 6,25 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

FIGURA 4: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 6,25 % de *Erythroxyllum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 6,25 % del extracto de *Erythroxylum coca* (7,6 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

TABLA 7: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 12,5% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 12.5%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	9 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	8 mm	5 mm	12 mm
Máximo	10 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	1	0.54	0.89

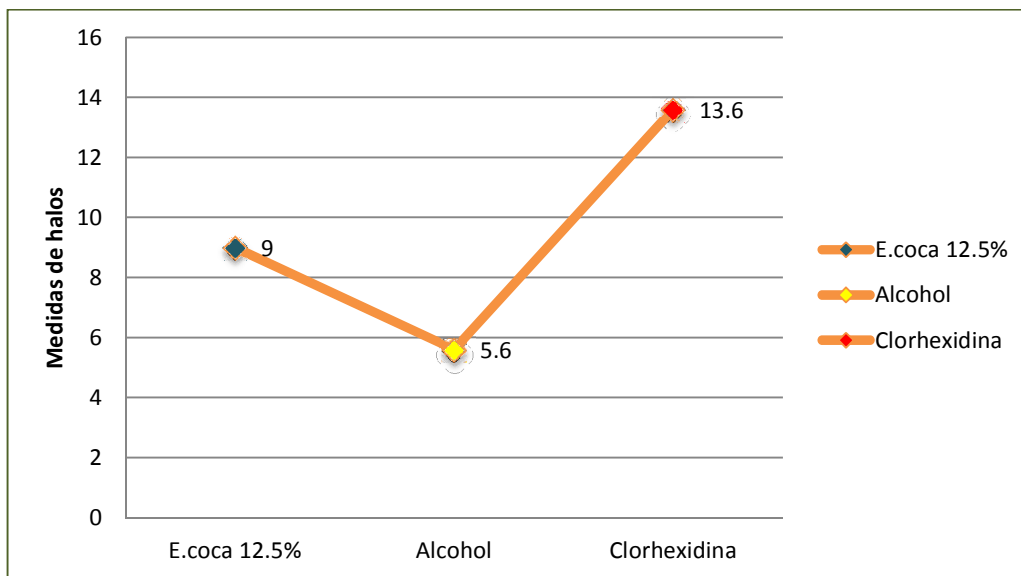
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 12,5 % del extracto de *Erythroxyllum coca* fue 9 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 8 y 10 mm respectivamente.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxyllum coca* 12,5 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxyllum coca* 12,5 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 5: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 12,5 % de *Erythroxyllum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 12,5 % del extracto de *Erythroxylum coca* (9 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

TABLA 8: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 25% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca	Alcohol 96°	Clorhexidina
	25%	(Control negativo)	(Control positivo)
Media	6.4 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	6 mm	5 mm	12 mm
Máximo	7 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	0.54	0.54	0.89

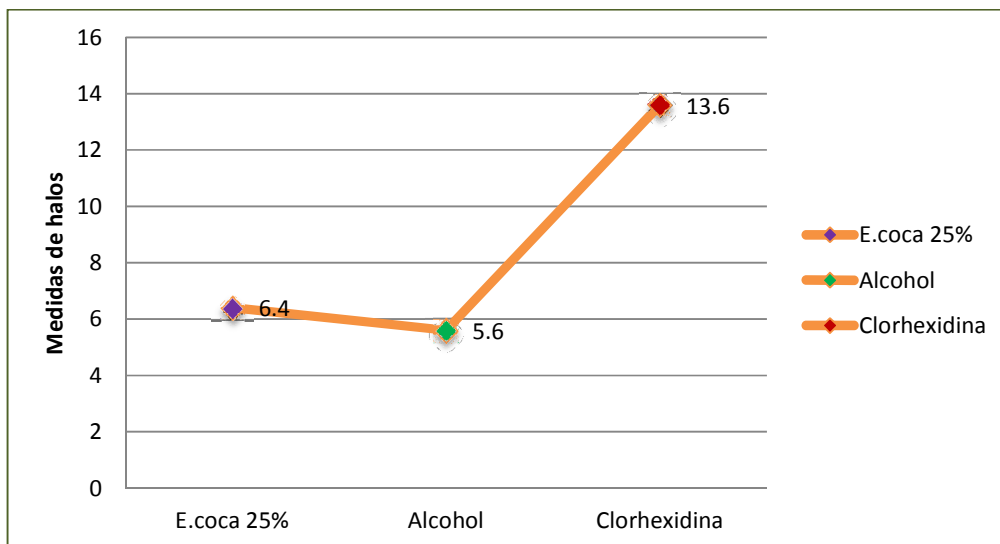
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 25 % del extracto de *Erythroxylum coca* fue 9 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 6 y 7 mm respectivamente.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 25 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 25 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 6: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 25 % de *Erythroxylum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 25 % del extracto de *Erythroxylum coca* (6,4 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

TABLA 9: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 50% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca 50%	Alcohol 96° (Control negativo)	Clorhexidina (Control positivo)
Media	7 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	6 mm	5 mm	12 mm
Máximo	8 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	1	0.54	0.89

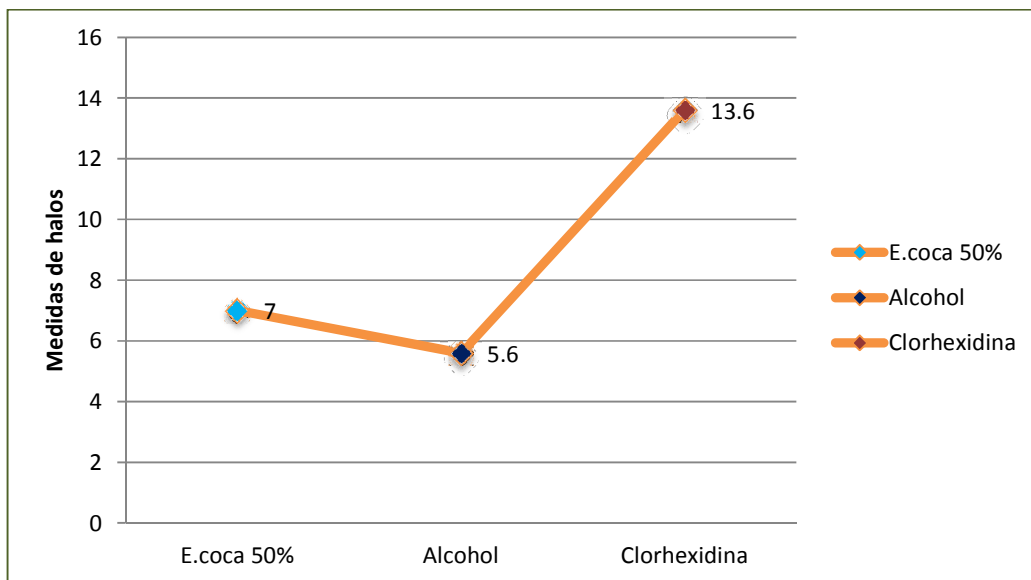
Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 50 % del extracto de *Erythroxylum coca* fue 7 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 6 y 8 mm respectivamente.

Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 50 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 50 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

FIGURA 7: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 50 % de *Erythroxylum coca*.



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 50 % del extracto de *Erythroxylum coca* (7 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

TABLA 10: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración de 100% del extracto de *Erythroxylum coca*

	Conc. E. coca	Alcohol 96°	Clorhexidina
	100%	(Control negativo)	(Control positivo)
Media	8.6 mm	5.6 mm	13.6 mm
Mínimo	7 mm	5 mm	12 mm
Máximo	10 mm	6 mm	14 mm
Desv. Est.	1.14	0.54	0.89

Los resultados indican que el valor promedio de la longitud de los halos de inhibición del crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes frente a la concentración 100 % del extracto de *Erythroxylum coca* fue 8,6 mm. Los valores mínimo y máximo fueron 7 y 10 mm respectivamente.

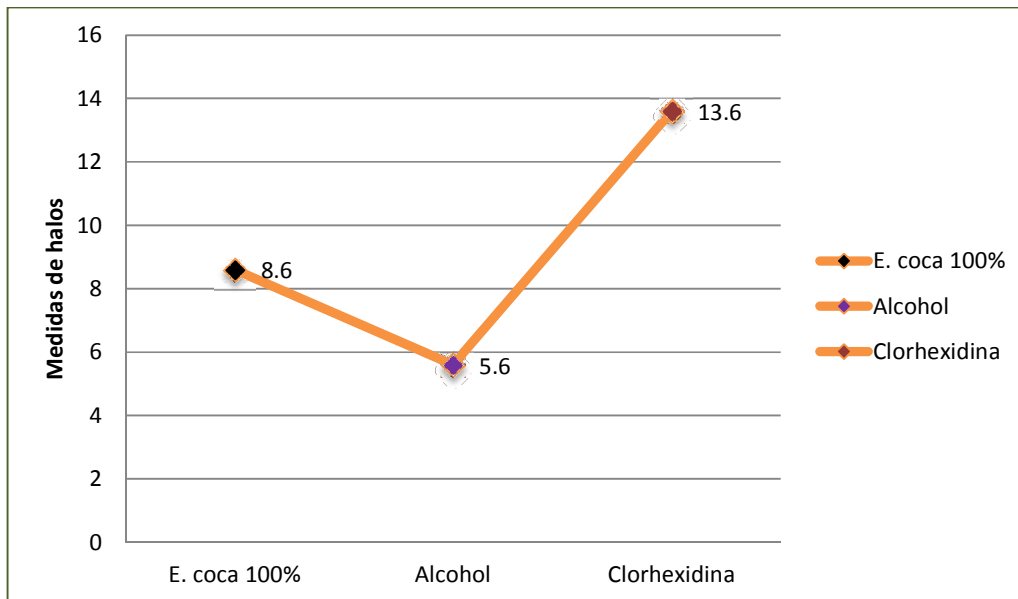
Los valores de las medias del grupo control negativo (Alcohol 96°) y positivo (Clorhexidina 0.12 %) fueron 5,6 y 13,6 mm respectivamente.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 100 %) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca* 100 %) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que sí existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

FIGURA 8: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de

***Bacilos Negro Pigmentantes* para la concentración de 100 % de *Erythroxylum coca*.**



El valor de la media de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* frente a la concentración 100 % del extracto de *Erythroxylum coca* (8,6 mm), fue mayor que el valor de la media del control negativo (5,6 mm) y menor al control positivo (13,6 mm).

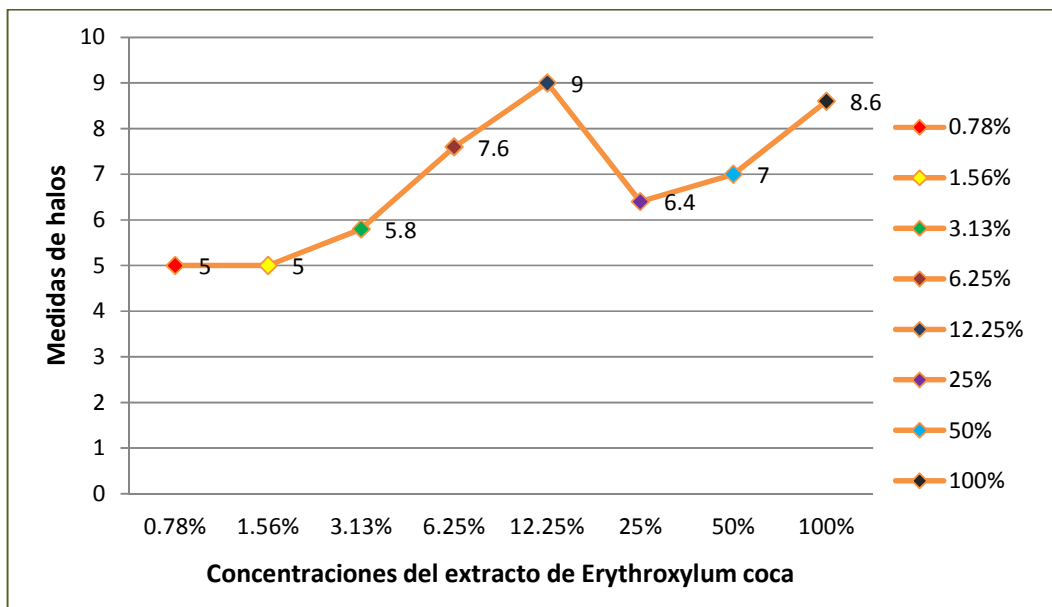
TABLA 11: Longitud de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* según las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>								
	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
Media	5 mm	5 mm	5.8 mm	7.6 mm	9 mm	6.4 mm	7 mm	8.6 mm
Mínimo	5 mm	5 mm	5 mm	6 mm	8 mm	6 mm	6 mm	7 mm
Máximo	5 mm	5 mm	6 mm	8 mm	10 mm	7 mm	8 mm	10 mm
Desv, Est.	0	0	0.44	0.89	1	0.54	1	1.14

Se observa que la mayor medida del halo de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* se dio frente a 12,5 % de la concentración de *Erythroxylum coca* (9 mm), seguida por la concentración de 100 % (8.6 mm), la concentración de 6,25 % (7,6 mm), la concentración de 50 % (7 mm), la concentración de 25 % (6,4 mm), la concentración de 3.13 % (5,8 mm), y las concentración de 1,56 % y 0,78 % (5 mm).

Al hacerse la comparación de las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca* mediante la prueba de Kruskal - Wallis, se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

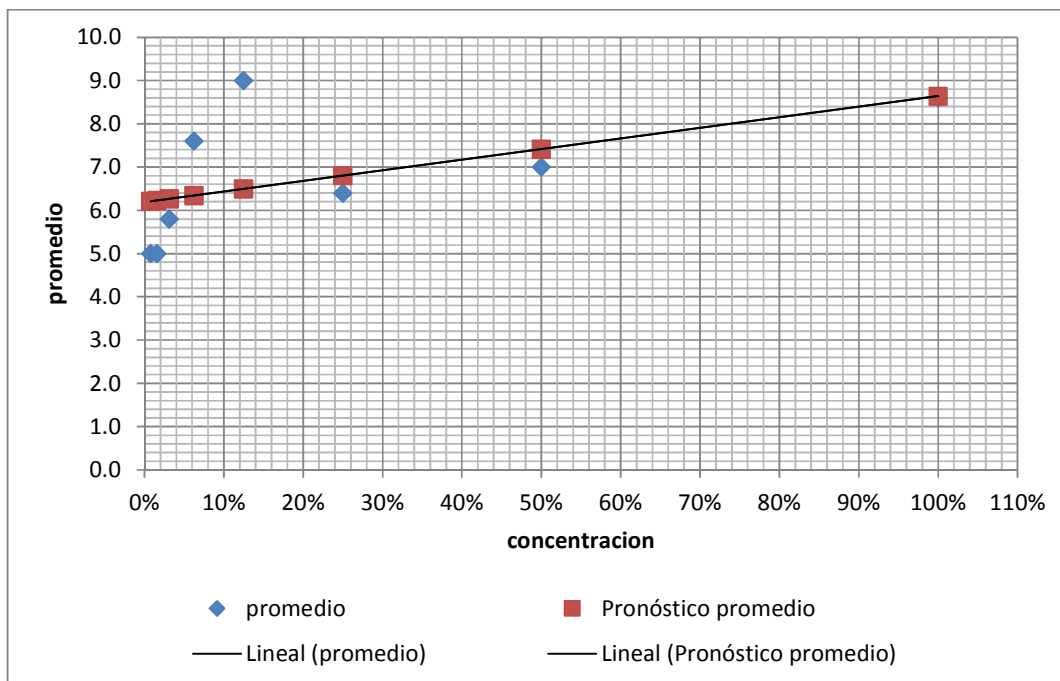
FIGURA 9: Medidas de los halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en relación a las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca*.



La mayor medida del halo de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* se dio frente a 12,5 % de la concentración de *Erythroxylum coca* (9 mm), seguida por la concentración de 100 % (8,6 mm), la concentración de 6.25 % (7,6 mm), la concentración de 50 % (7 mm), la concentración de 25 % (6,4 mm), la concentración de 3,13 % (5,8 mm), y las concentraciones de 1,56 % y 0,78 % (5 mm).

Por lo tanto, se puede observar que al 12,5% y al 100% se obtuvieron los mejores efectos antibacterianos del extracto, que en promedio son 9 y 8,6 mm (Sensibilidad límite).

FIGURA 10: Línea de tendencia o progresión lineal entre las medidas de halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en relación a las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca*.



La ecuación de la recta para este estudio fue $Y: 2.4505X + 6.1898$

El coeficiente de correlación de Pearson (r) encontrado fue $r: 0.5536$, indicando una relación directa no fuerte entre la variable dependiente (actividad antibacteriana) y la variable independiente (extracto de *Erythroxylum coca*). A su vez, el coeficiente de determinación ($r^2: 0.3065$), equivalente al 30,7 %, indicó que la variación en el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* se debe en un 30,7% por la variación en la concentración del extracto de *Erythroxylum coca*.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Erythroxylum coca* SOBRE *Bacilos Negro Pigmentantes* MEDIANTE EL TEST DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

TABLA 12: Crecimiento de *Bacterias Negro Pigmentantes* según las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

Concentración Extracto Coca (100 ul)	Sembrado BNP en caldo de cultivo Agar BHI (2.8 ml)	Tubo de Ensayo	Crecimiento Bacteriano				
			Grupo N° I	Grupo N° II	Grupo N° III	Grupo N° IV	Grupo N° V
			-	-	-	-	-
100%		1	++	+	+	++	+
50%		2	++	++	++	++	+
25%		3	+	+	+	+	++
12.5%		4	+	+	+	+	+
6.25%		5	+	++	++	+	+
3.13%		6	+++	++	++	+++	++
1.56%		7	++	++	+++	+++	++
0.78%		8					

Ausencia de crecimiento bacteriano: (-)

Crecimiento bacteriano: Escaso (+), Moderado (++), Abundante (+++)

De acuerdo a los resultados presentados en esta tabla, se observa que no hubo crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes en la concentración de 100% de extracto de *Erythroxylum coca*.

En el 100% de los casos restantes si hubo crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en las diferentes concentraciones, 0,78 %, 1,56%, 3,13%, 6,25%, 12,5%, 25% y 50% del extracto de *Erythroxylum coca*. Pero se observa una repotenciación del efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum coca* a las concentraciones de 12,5% y 6,25%

De acuerdo a los resultados, la concentración mínima del extracto de *Erythroxylum coca*, capaz de inhibir a la totalidad de los aislados de *Bacilos Negro Pigmentantes*, correspondió a 100%.

El efecto de las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes* se encuentra resumido en las tablas N° 13 y N° 14, y expresado como puntos de dispersión en el gráfico N° 12.

TABLA 13: Relación entre el crecimiento de aislados de *Bacilos Negro Pigmentantes* y las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

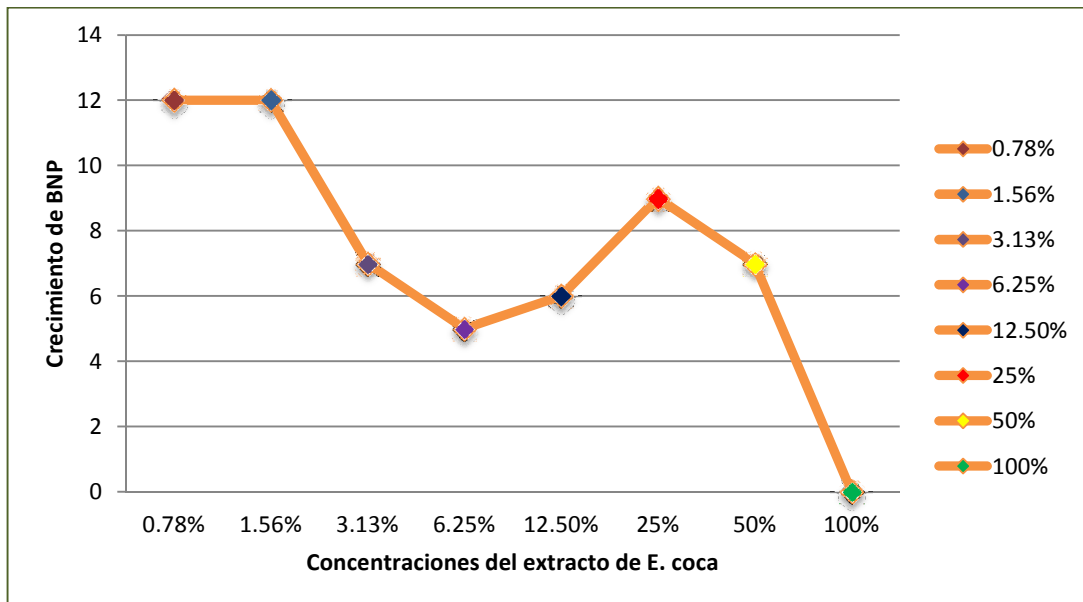
N°								
Crecimiento	Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>							
Aislados								
BNP	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
(+)	0	0	3	5	4	1	3	0
(++)	3	3	2	0	1	4	2	0
(+++)	2	2	0	0	0	0	0	0
(-)	0	0	0	0	0	0	0	5

En la Tabla 14 se expresan en porcentajes, los mismos resultados anteriores.

TABLA 14: Relación porcentual entre el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* y las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

N°								
Crecimiento	Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>							
Aislados								
BNP	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
(+)	0	0	60	100	80	20	60	0
(++)	60	60	40	0	20	80	40	0
(+++)	40	40	0	0	0	0	0	0
(-)	0	0	0	0	0	0	0	100

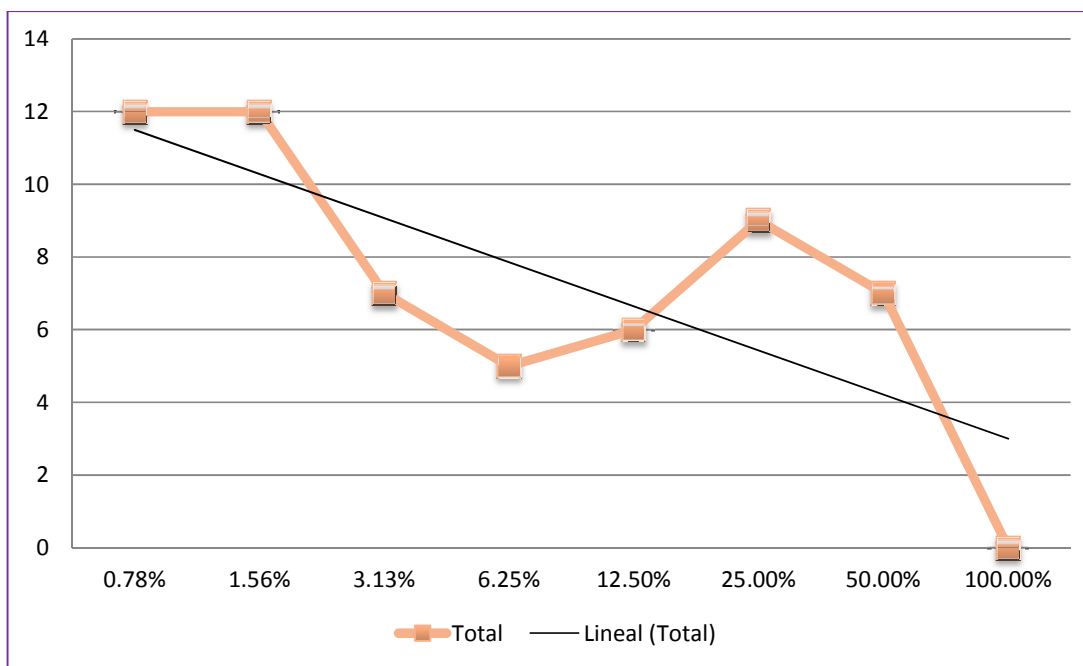
FIGURA 11: Crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en relación a las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca*



Se observa que no hubo crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en la concentración de 100 % de extracto de *Erythroxylum coca*.

En el 100 % de los casos restantes si hubo crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en las diferentes concentraciones, 0,78 %, 1,56%, 3,13%, 6,25%, 12,5%, 25% y 50% del extracto de *Erythroxylum coca*. Pero se observa una repotenciación del efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum coca* a las concentraciones de 12,5% y 6,25%

FIGURA 12 Línea de tendencia o regresión lineal entre el número de casos con crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en relación a las diferentes concentraciones de *Erythroxylum coca*.



La ecuación de la recta para este estudio fue $Y = -1.2143x + 12.714$

El coeficiente de correlación de Pearson (r) encontrado fue $r: 0.7590$ indicando una relación inversa muy fuerte entre el indicador de la variable dependiente (crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*) y la variable independiente (extracto de *Erythroxylum coca*). A su vez, el coeficiente de determinación ($r^2: 0.5761$), equivalente al 57,6%, indicó que la variación en el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* se debe en un 57,6% por la variación en la concentración del extracto de *Erythroxylum coca*.

V. DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación permitió un alcance preliminar al determinar in vitro que el extracto de *Erythroxylum coca*, tiene actividad antibacteriana sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*, evaluado mediante el Test de difusión en Agar con discos y la prueba de dilución en medio líquido.

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes* mediante un Test de difusión en Agar, nos permitió determinar un análisis de estimación lineal entre las concentraciones de *Erythroxylum coca* y la inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*, mostrando una recta con una pendiente pronunciada ($m: 2.4505$) desde una concentración de 0,78 % hasta el 100 % del extracto en estudio. Se observó una relación directa entre la variable independiente (coca) y el indicador de la variable dependiente (halos de inhibición del crecimiento bacteriano). El valor obtenido para el coeficiente de regresión, $r^2: 0.3065$, nos indicó que la variable extracto de *Erythroxylum coca* está influyendo en la inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* (en el 31 % de los casos se manifiesta esta influencia).

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca*) y el grupo control negativo (Alcohol 96°), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que para las concentraciones 0,78 %, 1,56 %, 3,13 %, 25 % y 50 % del extracto, no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$); pero para los resultados de las demás concentraciones (6,25 %, 12,5 % y 100 %), si existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se determina que la menor concentración del extracto de *Erythroxylum coca*, cuyos resultados presentan una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control negativo ($p < 0.05$), fue de 6,25 %.

Al realizar el análisis de los resultados del grupo experimental (extracto de *Erythroxylum coca*) y el grupo control positivo (Clorhexidina 0.12%), mediante la prueba U Mann Whitney, se determinó que todas las concentraciones (0,78

%, 1,56 %, 3,13 %, 6, 25 %, 12,5 %, 25 %, 50 % y 100%) del extracto, si existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se determina que la menor concentración del extracto de *Erythroxylum coca*, cuyos resultados presentan una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control positivo ($p < 0.05$), fue de 0,78%.

Los resultados de esta investigación, no se pueden comparar con resultados de otras investigaciones pues no se han trabajado con *Bacilos Negro Pigmentantes*, además los extractos de hoja de coca utilizados en los anteriores estudios, difieren entre sí, pues fueron elaborados con diferentes especies y en diferentes dependencias. Para este estudio, ENACO nos proporcionó un extracto cuya elaboración obedece estándares que garantizan la homogeneidad del producto, libre de alcaloides, pudiendo ser la base para la ejecución de futuros estudios relacionados.

El efecto antibacteriano del extracto de *Erythroxylum coca*, también es sustentado por otros trabajos de investigación como el de Ramos CA³, quien obtuvo un efecto antibacteriano positivo (sensibilidad límite) frente a la cepa ATCC de *Porphyromonas Gingivalis*, in vitro, con una concentración de 100% en el Test de Difusión en Agar con discos, y una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6,25% en el Test de Dilución en medio líquido. Si bien, el extracto empleado para dicho estudio también fue obtenido en ENACO, difiere en su composición con el extracto utilizado.

Los estudios de Minaya FP⁸, Castro LA¹⁸, Rojas SR¹⁴ y Vergara PC²⁴ demuestran que el extracto de *Erythroxylum coca* tiene propiedades antibacterianas sobre distintas cepas presentes en cavidad oral (*Staphylococcus*, *Streptococos*). El estudio de Borrovic RF⁷ evidenció la acción antibacteriana del extracto alcohólico de *Erythroxylum Novogranatense var. Truxillense* sobre la Flora mixta salival, según los resultados obtenidos existe un efecto antimicrobiano positivo a las concentraciones de 250, 500, 1000 y 1500 ug/ 20 ul del extracto, y se encontró diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición en las distintas concentraciones

utilizadas del extracto. Además indicó que a mayor concentración del extracto, existe mayor efecto antimicrobiano. Esto difiere en parte de los resultados obtenidos, puesto que sí observa efecto antibacteriano a la máxima concentración del extracto (100 %), pero también se observa una repotenciación a la concentración de 12,5 %. Esto puede ser debido a que el diluyente empleado es Alcohol 96°, y al ser diluido junto con el extracto (5:1), hasta lograr la concentración de 12,5 %, puede lograr un efecto de sinergismo, lo que se refleja en una repotenciación que se evidencia en el incremento del diámetro de los halos de inhibición en el Test de Difusión en Agar.

Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*, mediante la prueba de dilución en medio líquido, nos permitió determinar un análisis de estimación lineal entre las concentraciones de *Erythroxylum coca* y el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*, mostrando una recta con una pendiente pronunciada ($m: -1.2143$) desde una concentración de 0,78 % hasta 100 % del extracto en estudio. Se observó una relación inversa entre la variable independiente (*Erythroxylum coca*) y el indicador de la variable dependiente (crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*). El valor obtenido para el coeficiente de regresión, $r^2: 0.576$, nos indicó que la variable extracto de *Erythroxylum coca* está influyendo en el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*. (El extracto de *Erythroxylum coca* explica 57,6 % de la inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*).

El valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que inhibió el crecimiento del 100 % de los cultivos de *Bacilos Negro Pigmentantes*, en este estudio, fue 100 % de concentración del extracto de *Erythroxylum coca*. Este hallazgo no se puede comparar con otros estudios similares pues es un trabajo pionero en la búsqueda de esta CMI, pero además presentó repotenciación del efecto inhibitorio de crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* a la concentración de 12,5% y 6,25% del extracto de *Erythroxylum coca*.

De acuerdo a los valores de sensibilidad en el Aromatograma según Duraffourd, para los resultados obtenidos en el Test de difusión en Agar (halos

de inhibición de crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* inferiores a 9mm), resuelve que *Bacilos Negro Pigmentantes* presenta sensibilidad nula (-) frente a las concentraciones de 0,78 %, 3,13 %, 6,25 %, 25 % Y 50 % del extracto de *Erythroxyllum coca* y sensibilidad límite (sensibilidad: +, halos de inhibición de crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* de 9mm a 14 mm) para las concentraciones de 12,5 % y 100 % del extracto estudiado. Esta aseveración coincide con la conclusión que se desprende de la prueba de Dilución en medio líquido, la cual expresa que el extracto de *Erythroxyllum coca* tiene la propiedad de inhibir el crecimiento in vitro de *Bacilos Negro Pigmentantes* a concentraciones iguales a 100 %, y una repotenciación del efecto a la concentración de 12,5 y 6,25%.

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que el extracto de *Erythroxylum coca* (hoja de coca), tiene actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de *Erythroxylum coca* sobre el crecimiento bacteriano de *Bacilos Negro Pigmentantes* fue 100 %, según la prueba de dilución en medio líquido.

Se evidencia en el test de difusión en Agar, la actividad antibacteriana in vitro del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Bacilos Negro Pigmentantes*, dando sensibilidad positiva (límite) a las concentraciones de 12,5 % y 100 % de dicho extracto.

La prueba de dilución en medio líquido no evidenció una capacidad antibacteriana marcada, excepto al 100 % de concentración del extracto de *Erythroxylum coca*, pero si se aprecia una repotenciación de dicho efecto al 12,5 % y 6,25 % de concentración.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda trabajar en futuras investigaciones con diluciones de 100 %, 90 %, 80 %, 70 % del extracto de *Erythroxylum coca*, con el fin de encontrar una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) más exacta.

Estandarizar el extracto y los sistemas de medios de cultivos, para el estudio de la actividad antibacteriana de *Erythroxylum coca*; pues la especie y procedencia del extracto, así como también los agares y caldos de cultivo, tienen influencia en la actividad biológica de éste.

Se recomienda hacer estudios sobre la posibilidad de una acción sinérgica entre los compuestos antimicrobianos de *Erythroxylum coca* y los distintos fármacos antimicrobianos.

Realizar futuros estudios con cepas de *Bacilos Negro Pigmentantes* y otras especies bacterianas asociadas a la progresión de la enfermedad periodontal, aisladas de pacientes de nuestro medio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Moromi NH, Martinez CE, Ramos PD. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol Sanmarquina* 2009; 12(1): 25-28.
2. Aricapa BD. Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Tesis de Bachiller. Fac. Ciencias Básicas. Univ Javeriana. Bogotá. 2009.
3. Ramos CA. Actividad antibacteriana del extracto de *Erythroxylum coca* sobre *Porphyromonas Gingivalis*, estudio *in vitro*. Tesis de Bachiller. Fac. Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 2012.
4. Alvarado VV, Moromi NH. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman* var *truxillense* y *Camelia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. *Odontol Sanmarquina*. 2010; 13 (2): 21 – 25.
5. Goicochea IA. Estudio de la cavidad bucal en los sujetos habituados a la masticación de hojas de coca en la hacienda Collambay-Trujillo. Tesis de Bachiller. Fac. Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima 1954.
6. Rodríguez O. La coca y su repercusión bucodentaria en los sujetos habituados al chacchado en la región del alto chicama, La Libertad. Tesis de Bachiller. Fac. Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 1962.
7. Borrovic RF. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la hoja de *Erythroxylum Novogranatense* Var. *Truxillense* (coca) sobre flora mixta oral. Tesis de Bachiller. Fac Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 2006.
8. Minaya FP. Determinación de la actividad antibacteriana "*in vitro*" del extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* (coca) frente a bacterias orales cariogénicas. Tesis de Bachiller. Fac Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 2008.

9. Flores MF. Prevalencia de Caries, Enfermedad Periodontal y Desgaste Dentario en sujetos entre 40 y 70 años de edad según hábitos de masticación de hojas de coca en la comunidad de Quircan, Distrito de Mosca, Provincia de Ambo, Departamento de Huánuco. Tesis de Cirujano Dentista. Fac. Estomatología. UPCH. Lima. 1997.
10. Salama AM, Calderón JE, Sánchez NB. Contribución al estudio fitoquímico de algunas especies de *Erythroxylum coca* cultivadas en Colombia. Rev Colom de Ciencias Químico-Farmacéuticas. No. 22. 1994.
11. Hilgert NI. Especies vegetales empleadas en la insalivación de hojas de coca (*Erythroxylum coca* Var. Coca, *Erythroxylaceae*. Darwiniana 2000. 38(3-4): 241-252.
12. Ramos LE. Efectividad de la masticación de la Hoja de Coca en la prevención de la Caries dental en el centro poblado de San Juan de la Libertad Huasahuas-Tarma. Tesis de Bachiller. Fac Odontol: Univ Nac Federico Villareal. Lima. 2008.
13. Coronel M. Estudio comparativo de la prevalencia de caries, enfermedad periodontal y abrasión entre un grupo de sujetos con el hábito de masticación de hojas de coca y un grupo control en la Comunidad de Apaycauchilla, Provincia de Tarma. Tesis de Bachiller. Fac. Estomatol: Univ. Peruana Cayetano Heredia. Lima. 1988.
14. Castro LA. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. Tesis Doctorado. Fac Farmacia y Bioquímica: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 2008.
15. Rivier L. Analysis of alkaloids in leaves of cultivated *Erythroxylum* and characterization of alkaline substance used during coca chewing. Journal of Ethnopharmacology. 1981; 3: 313 – 335.

16. Brack EA. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Lima.1999.
17. Bartens SG. Cambios histológicos en el epitelio de la mucosa del carrillo, en sujetos masticadores de Hoja de coca, pertenecientes a la comunidad de Quircan, distrito de San Francisco, Provincia de Ambo, Departamento de Huánuco. Tesis de Bachiller. Fac. Estomatología. UPCH. 1998.
18. Stashenko EE. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de extractos de *Erythroxylum coca* Lam y *Coffea arabica* L. en un sistema lipídico modelo. Fac. Ciencias. Univ. Ind. De Santander. 2004.
19. Diaz SA, Perez VL, Chein VS. Efecto coagulante de dos variedades de hoja de coca en muestras de sangre de ratas albinas. Odontol. Sanmarquina 2007; 10(1): 7-9.
20. Gonzales CE, Melgarejo GC, Chavez CL. Efecto terapéutico del extracto etanólico de *Erythroxylum coca* spp. En anemia ferropénica inducida en ratas Holtzman macho. An Fac med. 2013;74(1):7-10.
21. Hurtado SC, Cartagena TD, Erostequi RC. Evaluación de la respuesta glucémica post-ingesta de la hoja de coca (*Erythroxylum coca*) en personas sin antecedente patológico metabólico. Rev Cient Cienc Méd v.16 n.1. 2013.
22. Ventura G, Castro A, Roque M, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Erythroxylum coca* Lam var y evaluación de su actividad antibacteriana. Cienc e Inv 2009; 12(1): 24-28.
23. Rojas SR. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de hoja de coca en comparación con Clorhexidina frente a *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Tesis de Bachiller. Fac Odontol: Univ Huánuco. Huánuco. 2011.
24. Vergara PC. Efecto inhibitorio in vitro del Extracto acuoso y Extracto etanólico de la hoja de *Erythroxylum novogranatense* var *truxillense* (coca) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Tesis de Bachiller. Fac. Estomatología. Universidad Nacional de Trujillo. 2011.

25. Guilarte C, Perrone M. Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. Acta odontol. Venez. 2005; 43(2): 198-204.
26. Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. J. Periodontal Res 1991. Res. 26 (4): 301-307.
27. Manfrin DS. Bacterias anaerobias estrictas de interés bucal. Odonto Moder 2008; 4 (46).
28. Pérez HL, De Armas CA, Fuentes AE. Prevalencia de enfermedad periodontal y factores de riesgo asociados. Rev Ciencias Médicas. 2011; 15 (2): 53-64.
29. Briceño CE, Pardi CG, Perrone CM. Nuevas especies del género Prevotella y su importancia en el área Odontológica: Revisión de la Literatura. Acta odontol. venez. 2009; 47 (4): 167-173.
30. Cabrera YM. Estudio microbiológico de la bacteria Prevotella Intermedia en el surco gingival de gestantes con diferentes grados de placa bacteriana- Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé. Tesis Bachiller. Fac. Odontol: Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima. 2004.
31. Ramos PD, Moromi NH., Martínez CE. *Porphyromonas gingivalis*: Patógeno predominante en la periodontitis crónica. Odontol Sanmarquina. 2011; 14 (1): 34-38
32. Carrillo de Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martinez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. J Clin Periodontol. 2010; 37(3): 230-240.

33. Abusleme L, Pozo P, Silva N. Genotipificación de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes con Periodontitis. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 54-58, 2009.
34. Ardila MC, Alzate VJ, Guzmán ZI. Asociación de *Prevotella intermedia/nigrescens*, bacilos entéricos gram-negativos y parámetros clínicos en periodontitis crónica. Av Periodon Implantol. 2013; 25 (3): 165-170.
35. Malm S, Jusko M, Eick S, Potempa J, Riesbeck K, et al. Acquisition of Complement Inhibitor Serine Protease Factor I and Its Cofactors C4b-Binding Protein and Factor H by *Prevotella intermedia*. PLoS ONE. 2012; 7(4): e34852.
36. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Prevalence of b-lactamase-producing bacteria in human periodontitis. J Periodont Res. 2013; 48 (4): 493-499.
37. Pfau EA, Avila-Campos MJ. *Prevotella Intermedia* and *Porphyromonas Gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. Braz. J. Microbiol. 2005; 36 (3): 281-285.
38. Rosado AA, Marcos GH, Gómez RP. Evidencias científicas de la relación entre Periodontitis y Enfermedades Cardiovasculares. Av Periodon Implantol. 2008; 20, 3: 173–181.
39. Díaz CA, Vivas RR, Puerta LL, Ahumado MM, Cabrales SR, Herrera HA. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la expresión de quorum sensing. Rev Cub Estomatol. 2010; 47(4): 404-416.
40. Quintero AJ, Prada P, Inostroza CM, Chaparro A. Presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm subgingival de

pacientes diabéticos tipo 2: estudio transversal. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 4(2); 54-58, 2011.

41. Ramos PD, Castro LA, Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* “Copaiba” sobre *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis. Odontol Sanmaquina. 2014; 17(1): 7 – 11.
42. Liñares J, Martín-Herrero JE. Bases fármaco microbiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplatarias. Av Periodon Implantol. 2003; 15(3): 139-147.
43. Zuñiga JD, Figueroa JY, Rodriguez SM. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la Periodontitis. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral vol.5 (1); 40-45, 2012.
44. Dawson, Beth, D. Trapp, Robert G. Bioestadística médica, 4a edición. Editorial El Manual Moderno SA. México. 2005. Capítulo 8: 175-197.

IX. ANEXOS

9.1 CUADROS DE CONSISTENCIA

ENACO S.A.

Empresa Nacional de la Coca S.A.
Departamento de Control de Calidad

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
FÍSICO QUÍMICO

N° 008-14 E

PRODUCTO : EXTRACTO ERC- A20
CODIGO DE PRODUCTO : 27
CANTIDAD : 200 mL
LOTE N° : 105272-05
FECHA DE EMISION : 10/10/2014

ANALISIS ORGANOLEPTICO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
ASPECTO	LÍQUIDO	APROBADO
OLOR	SUIGENERIS	APROBADO
SABOR	PROPIO	APROBADO


ANALISIS FÍSICOQUÍMICO	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
RESIDUO SECO (g%)	5.5 – 7.5 %	6.16 %
pH	4.9 – 5.6	5.13
PESO ESPECÍFICO (g/ml)	0.95 – 1.05%	1.006
ALCALOIDES ECGONINICOS (g%) Test Report N° 195-2013 USAQ -UNMSM	No detectable *	No detectable

* Recommended Methods for testing Cocaine -Manual for use by National Narcotics Laboratories ST/NAR/7
United Nations.División of Narcotic Drug

CONCLUSIÓN: El producto analizado Extracto ERC-A20, Lote 105272-05 cumple con las especificaciones descritas para el producto


Q.F. MARTHA ARIAS VEGA
N° CQE 00027



 ENACO S.A. Empresa Nacional de la Coca S.A. 263-1340 263-7219 FAX 263-7220 Av. Universitaria 602 Lima 32 Perú	CODIGO : E T P VERSIÓN : 06 FECHA : 09 Abril 2014
---	--

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL PRODUCTO

NOMBRE	EXTRACTO ERC A20 Nivel de alcaloides No detectable															
CODIGO DEL PRODUCTO	27															
DESCRIPCIÓN FÍSICA	Aspecto: Líquido. Color: Marrón. Adicionalmente debido a que el producto se obtiene de una materia prima natural, el color pueda variar de intensidad desde un marrón claro a un marrón oscuro. Oloro: Característico. Sabor: Característico.															
CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS	pH: 4.0 – 5.0 Residuo seco: 5.5 – 7.5 % Puntos equivalentes: 0.50 – 1.00 g/ml Nivel de alcaloides No detectable * Recomendación: Método for testing Cocaine -Manual for use by National Laboratories ST/NAR/7 United Nations Convention on Narcotic Drugs															
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	<table><tr><th>Agente microbiano</th><th>N</th><th>D</th><th>M</th><th>SE</th></tr><tr><td>Enzimas bacterianas</td><td>5</td><td>2</td><td>10³</td><td>10²</td></tr><tr><td>Mohos (total)</td><td>5</td><td>1</td><td>10³</td><td>10²</td></tr></table> Método: ST/NAR/7A DIGESA V.01 Red. total de microorganismos aerobios ufc/ml $\leq 10^3$ Red. total combinado de bacterias y Levaduras ufc/ml $\leq 10^2$ USP 36 - 31-Vol. 1	Agente microbiano	N	D	M	SE	Enzimas bacterianas	5	2	10 ³	10 ²	Mohos (total)	5	1	10 ³	10 ²
Agente microbiano	N	D	M	SE												
Enzimas bacterianas	5	2	10 ³	10 ²												
Mohos (total)	5	1	10 ³	10 ²												
APLICACIONES	Como agente saborizante en la industria alimentaria: bebidas energéticas, refrescos, caramelos, etc. Cantidad sugerida 1 – 3 g/L.															
EMPAQUE Y PRESENTACIÓN	El producto está contenido en bidones de PVC por 20L o a solicitud, en envases de menor presentación.															
VIDA ÚTIL ESPERADA	2 Años en condiciones de almacenamiento adecuadas.															
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	Almacenar en áreas frescas y secas protegido de la luz, a una temperatura no mayor de 25°C.															
ETIQUETA	Nombre del producto N° de lote Cantidad															



Q.F. SILVERIO GARCÍA RIVERA
 QUÍMICO FARMACÉUTICO COF. N° 1438
 DIRECTOR TÉCNICO

9.2 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR

HALOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Bacilos Negro Pigmentantes*
SEGÚN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Erythroxylum coca*

Discos con concentración coca (100 ul)	Sembrado en Placa Petri (Agar Schadler)	Disco N°	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano				
			Placa Petri N°	Placa Petri	Placa Petri	Placa Petri	Placa Petri
			I	N° II	N° III	N° IV	N° V
100%		1					
50%		2					
25%		3					
12.5%		4					
6.25%		5					
3.13%		6					
1.56%		7					
0.78%		8					
Control (+)		9					
Control (-)		10					

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA EL TEST DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

CRECIMIENTO DE *Bacilos Negro Pigmentantes* SEGÚN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Erythroxylum coca*

Concentración Extracto Coca (100 ul)	Sembrado BNP en caldo de cultivo Agar BHI (2.8 ml)	Tubo de Ensayo	Crecimiento Bacteriano				
			Grupo N° I	Grupo N° II	Grupo N° III	Grupo N° IV	Grupo N° V
100%		1					
50%		2					
25%		3					
12.5%		4					
6.25%		5					
3.13%		6					
1.56%		7					
0.78%		8					
Control (+)		9					
Control (-)		10					

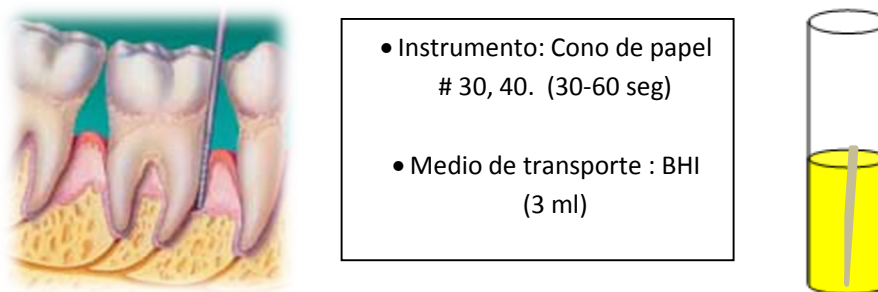
Ausencia de crecimiento bacteriano: (-)

Crecimiento bacteriano: Escaso (+), Moderado (++), Abundante (+++)

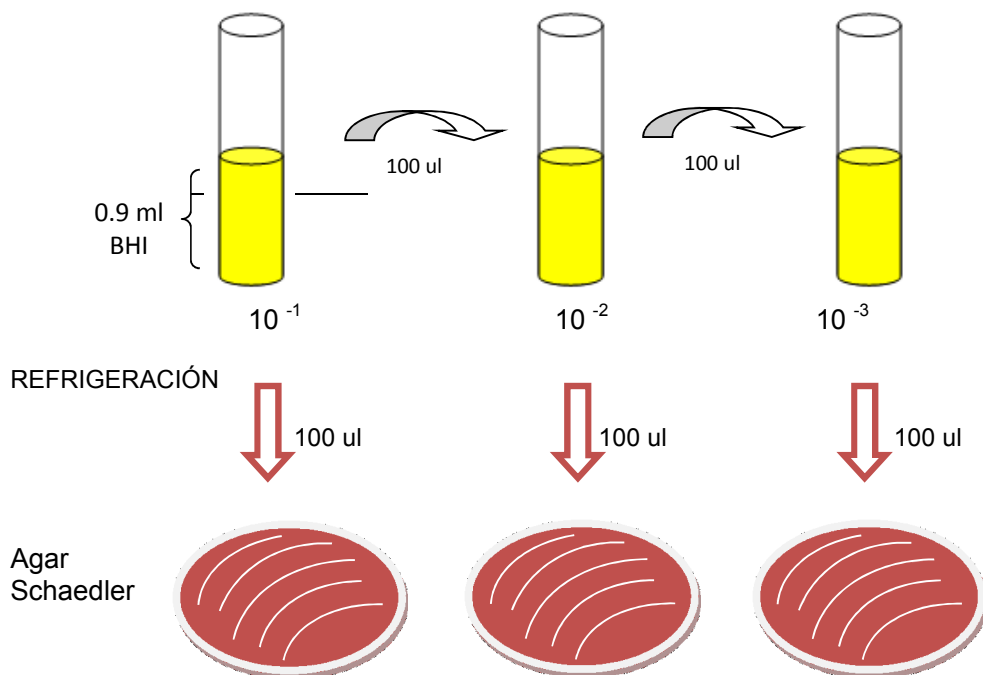
9.3 CUADROS Y GRÁFICOS

FLUXOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

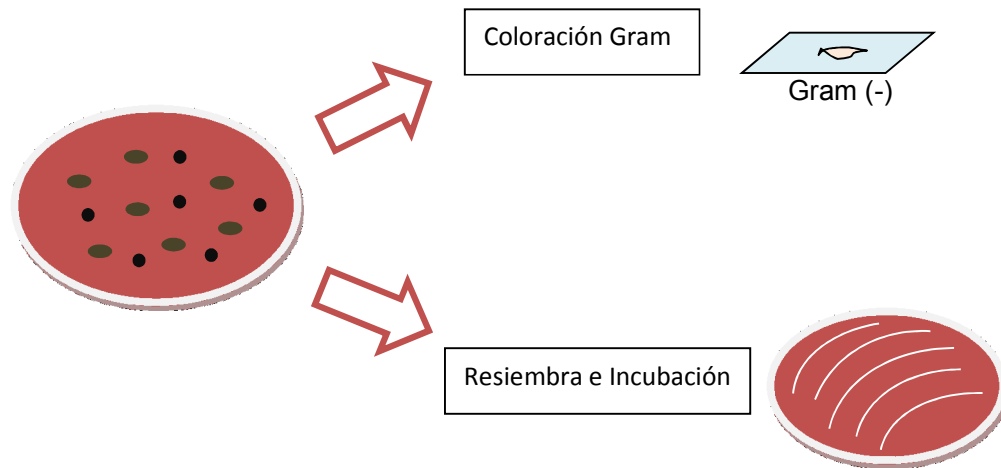
TOMA DE MUESTRA



DILUCIÓN

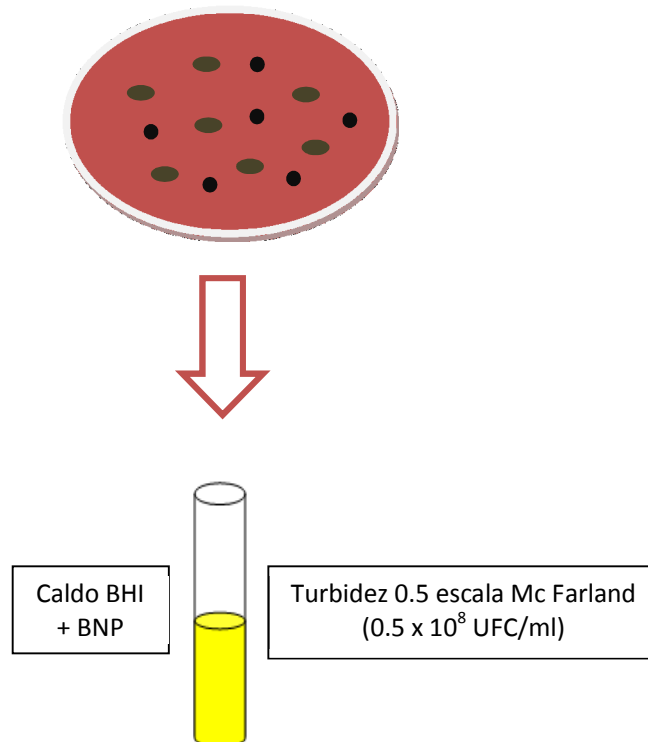


INCUBAR EN ANAEROBIOSIS (JARRA), A 37°C, POR 7-14 DÍAS

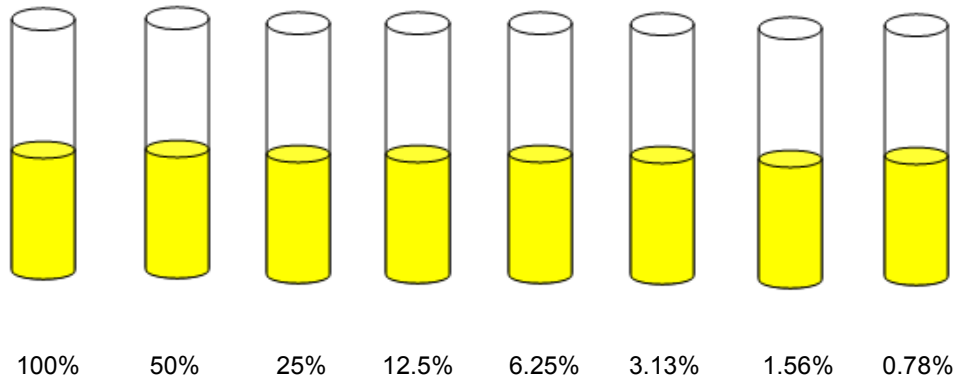


INCUBAR EN ANAEROBIOSIS (JARRA), A 37°C, POR 7-14 DÍAS

Muestra estandarizada

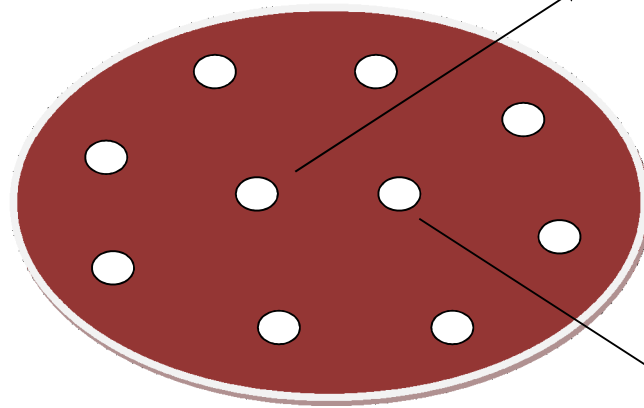


EXTRACTO DE COCA



TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR

Discos embebidos
con Extracto
de coca

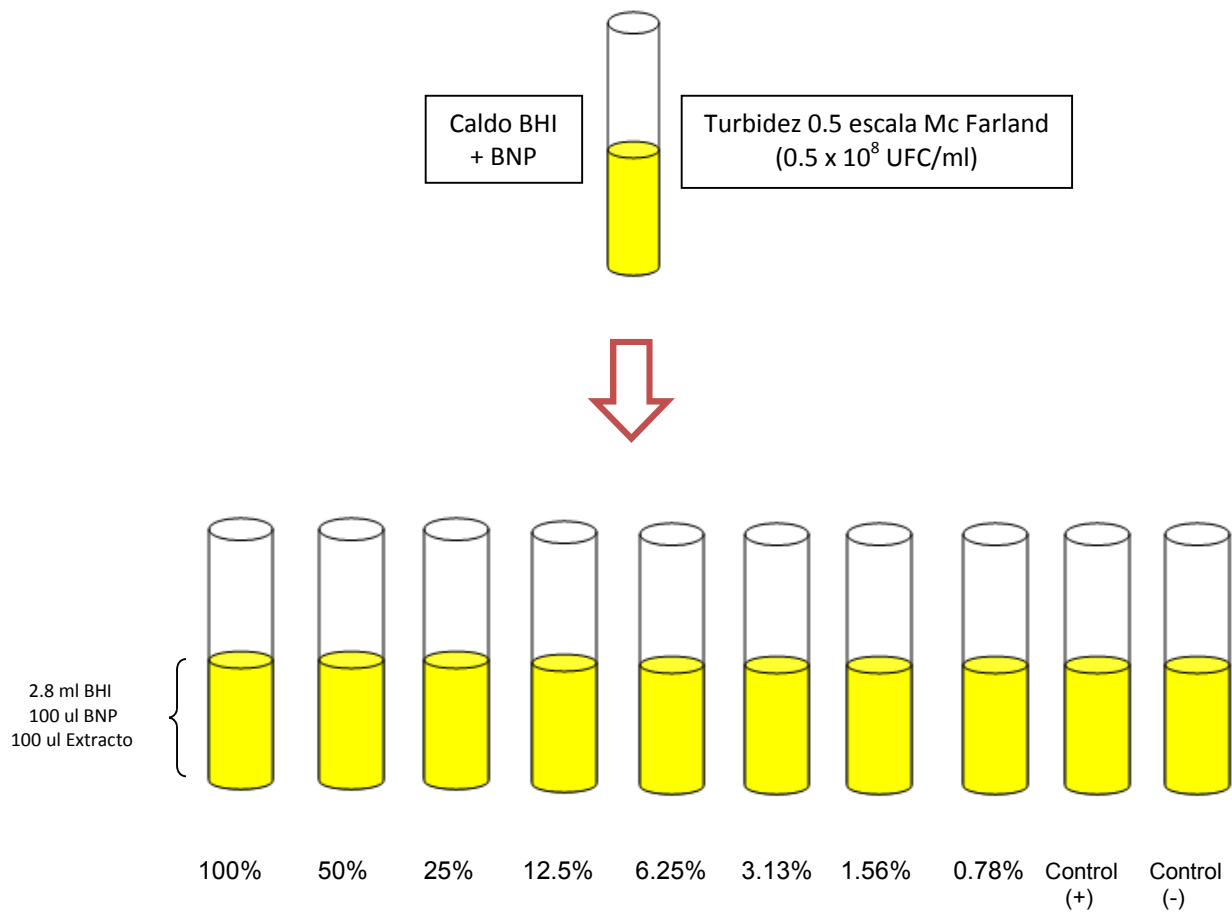


Control (+): Clorhexidina

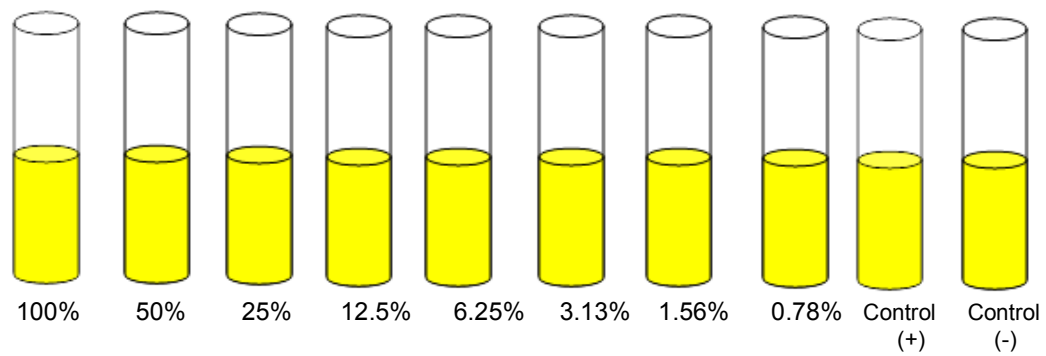
Control (-): Alcohol 96°

INCUBAR EN ANAEROBIOSIS (JARRA), A 37°C, POR 7-14 DÍAS

TEST DE DILUCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO



INCUBAR EN ANAEROBIOSIS (JARRA), A 37°C, POR 5 -7 DÍAS



CMI

9.4 TABLAS DE INTERPRETACIÓN DE DATOS

Halos de inhibición de crecimiento *de Bacilos Negro Pigmentantes* según las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

	Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>									
	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%	C (-)	C (+)
HALOS	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%	n n%
5 mm										
6 mm										
7 mm										
8 mm										
9 mm										
10 mm										
12 mm										
14 mm										
Total										
Media										

Crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes* en relación a las diferentes concentraciones del extracto de *Erythroxylum coca*

Concentración del extracto de <i>Erythroxylum coca</i>								
Nº								
Crecimiento o asilados	0.78%	1.56%	3.13%	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
BNP								
(+)								
(++)								
(+++)								
(-)								

9.5 FIGURAS



FIGURA 1: Toma de muestra de bolsa periodontal

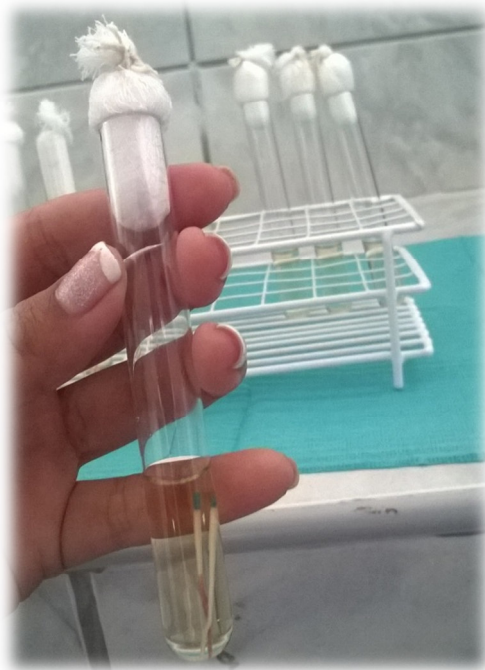


FIGURA 2: Almacenamiento en el medio de transporte (BHI)



FIGURA 5: Crecimiento bacteriano de muestra de bolsa periodontal. Se observan colonias Negro Pigmentantes, para resiembra y purificación

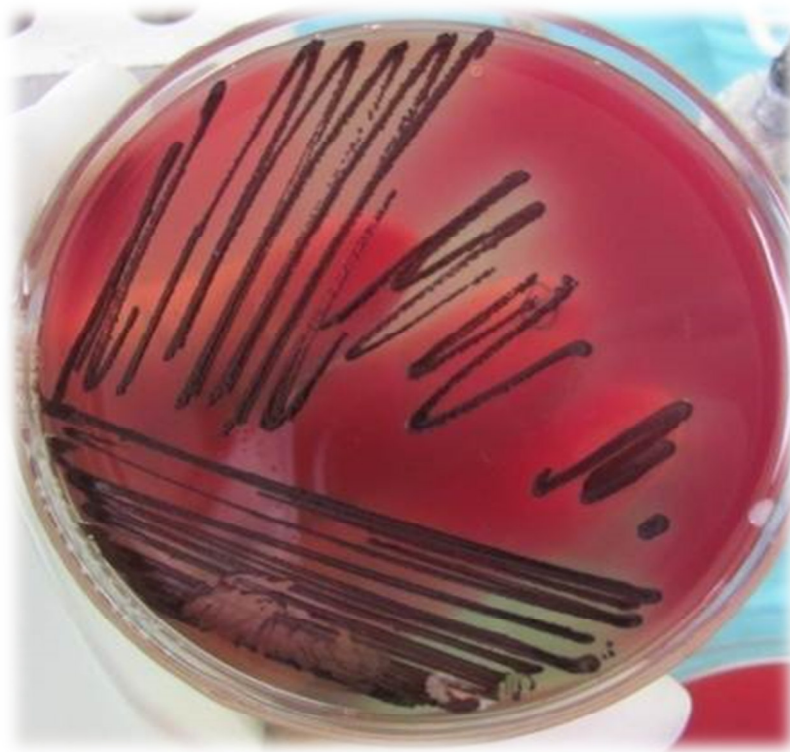


FIGURA 6: Bacterias Negro Pigmentantes

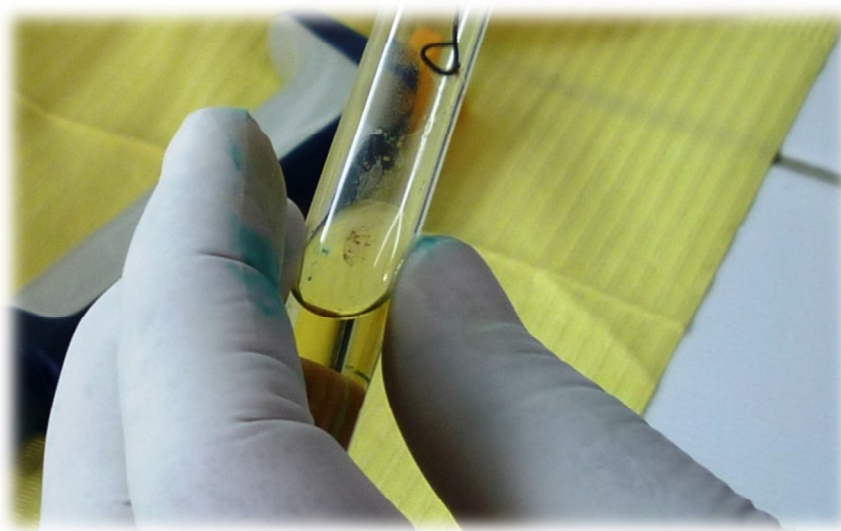


FIGURA 7: Suspensión de alícuotas de Bacilos Negro Pigmentantes en BHI, hasta conseguir Turbidez 0.5 escala Mc Farland (0.5×10^8 UFC/ml)

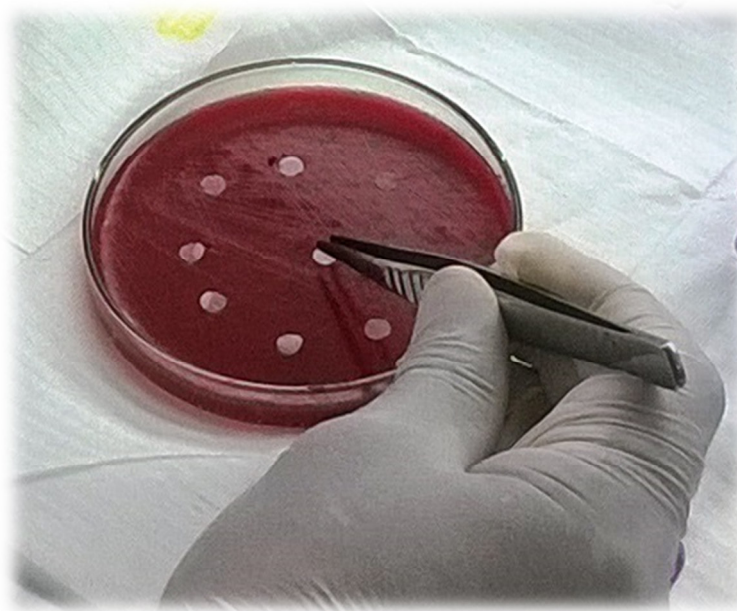


FIGURA 08: Disposición de los discos de papel embebidos en extracto de E. coca



FIGURA 9: Incubación en Jarra de Anaerobiosis, con sobre generador Anaerocult.

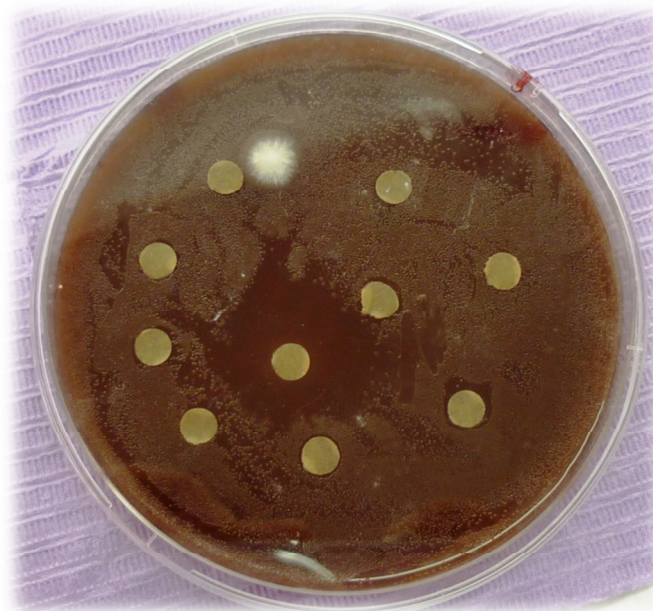


FIGURA 10: Halos de inhibición del crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes

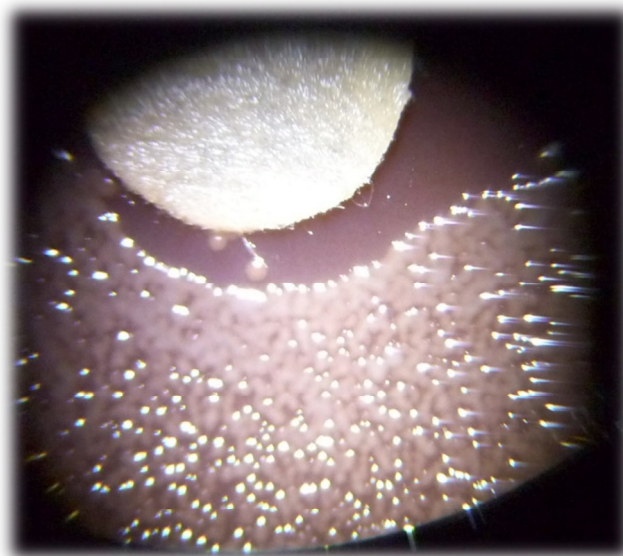


FIGURA 11: Halos de inhibición del crecimiento de *Bacilos Negro Pigmentantes*, visto al Estereoscopio



FIGURA 12: Sembrado en tubos de BHI, para prueba en medio líquido



FIGURA 13: Incubación en Jarra de Anaerobiosis por 5 días



FIGURA 14: Lectura de la Prueba de Dilución en Medio Líquido. A la concentración de 100% del extracto, no se observa turbidez.